

*Rosa Rodríguez Fernández*

Bronquiolitis por Virus Respiratorio Sincitial:  
Estudio prospectivo de la evolución temporal de  
los marcadores inmunológicos de infección y su  
relación con las sibilancias recurrentes.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



TESIS DOCTORAL

“Bronquiolitis por Virus Respiratorio Sincitial: Estudio prospectivo de la evolución temporal de los marcadores inmunológicos de infección y su relación con las sibilancias recurrentes”

Dña Rosa M. Rodríguez Fernández

Directoras:

Dra Teresa Hernández- Sampelayo Matos

Dra Maria Ángeles Muñoz Fernández

Madrid, Abril del 2015.





TERESA HERNÁNDEZ SAMPELAYO-MATOS, PROFESORA ASOCIADA DE PEDIATRÍA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y JEFE DE SERVICIO DE PEDIATRÍA DEL HOSPITAL MATERNO-INFANTIL GREGORIO MARAÑÓN Y MARIA ANGELES MUÑOZ FERNÁNDEZ, JEFE DE SECCIÓN DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN, JEFE DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN y PROFESORA HONORARIA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que doña Rosa María Rodríguez Fernández ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo presentado como proyecto de Tesis Doctoral "*Bronquiolitis por Virus Respiratorio Sincitial: Estudio prospectivo de la evolución temporal de los marcadores inmunológicos de infección y su relación con las sibilancias recurrentes*". Dicho trabajo cumple según nuestro criterio todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis para alcanzar el grado de Doctor.

En Madrid a 6 de Abril de 2015.

Fdo. Dra T. Hernández Sampelayo-Matos

Dra M.A. Muñoz Fernández



## **AGRADECIMIENTOS**

- A mi hija Lucía, por su apoyo incondicional, por confiar siempre en mí, por decirme que está orgullosa de mí, por su paciencia, por sus magníficas ideas, por su curiosidad científica que estimula la mía y por hacerme sentir tan feliz.
- A mi familia por enseñarme el valor del trabajo bien hecho, por mostrarme el camino de la responsabilidad y del esfuerzo, por ayudarme a superar todas las contrariedades y compartir conmigo las alegrías.
- A Octavio, por estar siempre a mi lado y de mi lado, por transmitirme esa paz tan necesaria, por pasear conmigo al lado del mar explicándome los complejos mecanismos inmunológicos del organismo, por sus sonrisas, por convencerme de que soy capaz y por hacerme sentir tan especial.
- A Maribel González, mi amiga, mi compañera, por compartir conmigo el día a día, por ayudarme a sobrevivir muchos de esos días, porque siempre está ahí, en lo bueno y en lo malo, en lo personal y en lo profesional, por su inteligencia y su sentido común, porque confío plenamente en ella.
- A Felipe González, mi amigo, mi compañero, por su simpatía, por su alegría de vivir, porque me hace reír todos los días, por sus consejos siempre acertados, por su generosidad y su capacidad de trabajo, porque siempre está dispuesto a seguirme en todas mis aventuras, algunas arriesgadas.
- A Asunción Mejías, mi amiga, que empezó siendo mi residente y ahora se ha convertido en mi mentora, espero que esté tan orgullosa de mí como yo lo estoy de ella. Por esa corriente de complicidad y cariño que se establece siempre que estamos juntas, por su optimismo y su generosidad, por ayudarme siempre, por confiar en mí.
- A mis compañeros del hospital, Mar Santos, César Sánchez, Guillermo Álvarez-Calatayud, Mar Tolín, Marisa Navarro, Jesús Saavedra, Petra Sánchez, Antonio Salcedo y Juan Luis Rodríguez Cimadevilla por su apoyo, su amistad y por esos desayunos de confidencias y risas que me dan energía para afrontar cada día.

- A Jimena Pérez, la benjamina de nuestro grupo, que tan bien se ha integrado, que tan bien comprende la importancia de la Pediatría y que tantos ratos libres me ha dejado para terminar esta Tesis.
- A Toño Gómez, mi amigo, que me enseñó los fundamentos de la Pediatría y de las Enfermedades Infecciosas, que me enseñó el arte de mi profesión. A mis otros maestros, Teresa Hernández-Sampelayo, Jesús Fermosel, Ignacio Arana, Carmen Aritmendi, Manuel Zapatero, Bonifacio Escudero, Vicente Climent y Jose Luis Morales gracias por todo lo que me habéis enseñado.
- A Teresa Hernández- Sampelayo, mi directora de Tesis, por su gran ayuda, por su inteligencia, por su profesionalidad, por sus consejos tan sabios, por su ejemplo, por su amistad, por la complicidad y por saber que siempre puedo contar con ella.
- A Mari Angeles Muñoz, mi otra directora de Tesis, por su profesionalidad, por su buena disposición, por dedicarme su tiempo y por allanarme el camino en la realización de estos complejos exámenes. Gracias.
- A las enfermeras, auxiliares, celadores, personal de limpieza y personal administrativo de las Plantas de Hospitalización de Pediatría del Hospital infantil Gregorio Marañón, especialmente a Jesús Álvarez, allí donde esté, por haberme ayudado a llevar los "biomocos" al laboratorio, porque siempre estaba de buen humor, por su profesionalidad, por haberme enseñado lo importante que es que cada uno haga bien su trabajo.
- Al personal del biobanco por su profesionalidad.
- A los pacientes y a sus familias, por su generosidad y por todo lo que he aprendido de ellos.







## I.- ÍNDICE GENERAL

[illegible]

<i>Capítulo 2. Justificación del Estudio</i> .....	57
2.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	59
<i>Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos</i> .....	61
3.1.- HIPÓTESIS: .....	63
3.2.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	63
3.2.1.- Objetivos principales .....	63
<i>Capítulo 4. Material y Métodos</i> .....	65
4.- DISEÑO, PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS .....	67
4.1.- Localización del estudio .....	67
4.2.- Definiciones.....	68
4.3.- Diseño del estudio .....	69
4.4.- Pacientes .....	70
4.4.1.- Criterios de inclusión .....	70
4.4.2.- Criterios de exclusión .....	71
4.4.3.- Seguimiento de los pacientes .....	71
4.4.4.- Identificación de los pacientes y confidencialidad .....	72
4.5.- MATERIAL Y METODOS .....	72
4.5.1.- Evaluación clínica .....	72
4.5.2.- Medición de citoquinas .....	73
4.5.3.- Envío y procesamiento de las muestras .....	74
4.5.4.- Aislamiento y Tipificación del VRS .....	75
4.5.5.- Análisis estadístico de los datos .....	76
<i>Capítulo 5. Resultados</i> .....	78
5.1.- EL HUESPED. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA. ....	79
5.1.1.- Datos generales .....	79
5.1.2.- Controles sanos.....	80
5.1.3.- Sibilancias recurrentes .....	80

5.2.- CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.....	82
5.2.1.- Clasificación filogenética de los virus .....	82
5.2.2.- Relación entre el tipo de virus A/B y la gravedad y el curso evolutivo de la bronquiolitis .....	84
5.3.- INTERACCIÓN VIRUS-HUESPED. LA RESPUESTA INMUNE.....	86
5.3.1- La edad y su influencia en los niveles de citoquinas en sangre y secreciones respiratorias en la muestra basal y en las muestras de la convalecencia.....	86
5.3.2- El género y su influencia en los niveles de citoquinas en sangre y secreciones respiratorias en la muestra basal y en las muestras de la convalecencia.....	91
5.3.3.- Diferencias en el patrón de citoquinas entre los casos y los controles sanos en muestras basales y en convalecencia.....	92
5.3.4- Gravedad .....	96
5.3.4.1.- Relación gravedad/ sibilancias persistentes.....	96
5.3.5.- Edad, género y sibilancias.....	96
5.3.5.1.- Relación edad/ sibilancias persistentes.....	96
5.3.6.- Correlaciones entre el perfil de IL y la gravedad .....	97
5.3.6.1.- Correlaciones entre las principales IL en plasma en el momento basal y en convalecencia y los parámetros de gravedad.....	97
5.3.6.2.- Correlaciones entre las principales IL en secreciones respiratorias en el momento basal y los parámetros de gravedad.....	101
5.3.7.- Relación entre el hemograma, los niveles de IL y el desarrollo de sibilancias postbronquiolitis .....	102
5.3.7.1.- Relación leucocitos, linfocitos, neutrofilos y eosinófilos y los niveles en plasma de algunas interleuquinas.....	102
5.3.7.2.- Relación entre el hemograma y el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis y las concentraciones de citoquinas.....	103

5.3.8.- Relación entre los perfiles de IL en plasma en el momento basal, al mes y al año de evolución y el desarrollo de sibilancias recurrentes .....	105
5.3.8.1.- Relación entre las citoquinas plasmáticas y las sibilancias postbronquiolitis.....	105
5.3.8.1.1.- Relación IL en plasma basal y sibilancias recurrentes .....	105
5.3.8.1.2.- Relación IL en plasma al mes de evolución y sibilancias recurrentes. ....	106
5.3.8.1.3.- Relación entre las IL en plasma al año de evolución y sibilancias recurrentes. ....	108
5.3.8.2.- Relación entre las IL en secreciones respiratorias y sibilancias recurrentes.....	112
5.3.8.3.- Relación entre las IL en plasma y secreciones respiratorias y el número de episodios de sibilancias recurrentes.....	112
5.3.8.4.- La respuesta inmune Th1, Th2, Th10 y Th17 y el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis ...	113
5.3.9.- Correlación entre las IL plasma y las IL en secreciones respiratorias .....	114
5.3.10.- Curvas ROC de predicción de sibilancias recurrentes y de gravedad.....	118
<i>Capítulo 6. Discusión .....</i>	<i>121</i>
6.1.- INTRODUCCIÓN .....	123
6.2.- IMPORTANCIA DEL VIRUS. TIPOS A Y B.....	125
6.3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DE LA SERIE.....	127
6.4.- LA EDAD Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A VRS. ....	127
6.5.- EL GÉNERO Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A VRS .....	131
6.6.- LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A VRS .....	132

6.7.- LA GRAVEDAD DE LA BRONQUIOLITIS Y SU RELACIÓN CON LAS CONCENTRACIONES DE CITOQUINAS.....	133
6.8.- RELACION ENTRE EL HEMOGRAMA, LOS NIVELES DE IL Y EL DESARROLLO DE SIBILANCIAS POSTBRONQUIOLITIS .....	136
6.9.- INTERACCIÓN VIRUS-HUÉSPED. LA RESPUESTA INMUNE EN RELACIÓN A LA BRONQUIOLITIS VRS Y LAS SIBILANCIAS RECURRENTES. ....	138
6.9.1.- La IL 10 y las sibilancias recurrentes .....	138
6.9.2.- La IL 17 y las sibilancias recurrentes. ....	140
6.9.3.- La IL 8 y las sibilancias recurrentes.....	142
6.9.4.- El TNF y las sibilancias recurrentes.....	143
6.9.5.- El IFN y las sibilancias recurrentes .....	144
6.9.6.- Evolución temporal de las concentraciones de citoquinas y el desarrollo de sibilancias recurrentes.....	146
6.10.- INTERACCIÓN VIRUS-HUÉSPED. LA RESPUESTA INMUNE TH1 Y TH2 .....	149
6.11.- DISCREPANCIA ENTRE LA PRODUCCION DE CITOQUINAS EN SANGRE PERIFERICA Y EN SECRECIONES NASALES EN LACTANTES CON BRONQUIOLITIS .....	153
6.12.- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL TNF PLASMATICO AL MES DE EVOLUCION EN LA BRONQUIOLITIS POR VRS Y SU VALOR PREDICTIVO EN LAS SIBILANCIAS RECURRENTES. ....	155
<i>Capítulo 7. Conclusiones .....</i>	<i>157</i>
7.1.- CONCLUSIONES .....	159
<i>Capítulo 8. Aplicaciones prácticas .....</i>	<i>162</i>
8.1.- APLICACIONES PRÁCTICAS DE ESTA TESIS.....	165

<i>Capítulo 9. Anexos</i> .....	167
9.1.- ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO BIOBANCO .....	169
9.2.- ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS DEL BIOBANCO .....	179
9.3.- ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO CLINICO...	181
9.6.- ANEXO 6. SCORE DE GRAVEDAD .....	192
9.7.- ANEXO 7. AUTORIZACION COMITÉ DE ETICA .....	193
Capítulo 10. Bibliografía .....	195
10.1.- BIBLIOGRAFÍA.....	197



## **II.- ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.- Imágenes microscópicas del VRS. Ultraestructura del VRS. ....	19
Figura 2.- Estructura de la proteína F de superficie del VRS. ....	21
Figura 3.- Formas "pre y post-trigger" de la proteína F . ....	21
Figura 4.- Estructura del VRS .....	23
Figura 5.- Anticuerpos frente al VRS.....	48
Figura 6.- Papel que juegan las diferentes células en la respuesta inmune ...	52
Figura 7.- Respuestas inmunológicas Th1, Th2 y Th17. ....	54
Figura 8.- Paneles de IL para las respuestas Th1, Th2, Th17 e inflamación ..	74
Figura 9.- Procedimiento de aislamiento y rescate del VRS .....	75
Figura 10.- Relación entre la estancia media (días) y el score de gravedad ..	79
Figura 11.- Árbol filogenético y distribución por genotipos .....	84
Figura 12.-Relación entre los subtipos de VRS y las sibilancias recurrentes ..	85
Figura 13.-Relación entre los subtipos de VRS y los niveles de IFN. ....	85
Figura 14.-Relación entre los niveles de IFN en plasma(basal) y la edad.....	89
Figura 15.-Relación entre los niveles de TNF en secreciones respiratorias en el momento basal y la edad .....	90
Figura 16.-Relación entre los niveles de IL10 en secreciones y la edad.....	90
Figura 17.-Relación entre la IL1B en secreciones respiratorias y la edad.....	91
Figura 18.- Concentraciones de IFN basal varones/mujeres .....	92
Figura 19.- Diferencia en las concentraciones de IFN plasmático entre casos y controles con y sin sibilancias recurrentes.....	93
Figura 20.- Diferencias en las concentraciones de IL10 en plasma entre casos y controles .....	94
Figura 21.- Diferencias en el score de gravedad y las concentraciones de TNF en plasma basal .....	98
Figura 22.- Correlaciones positiva entre IL 8 plasma basal y la estancia media y el IFN plasmático al mes y el score de gravedad .....	99
Figura 23.- Correlación positiva entre los niveles de IFN al año en plasma y el número de episodios de sibilancias recurrentes .....	100
Figura 24.- Correlación positiva entre la IL17 al año en plasma y el número de episodios de sibilancias .....	100
Figura 25.- Relación entre la IL8 en secreciones y la gravedad.....	102

Figura 26.- Relación entre las concentraciones de IFN e IL 8 en plasma y los neutrófilos.....	104
Figura 27.- Asociación entre las concentraciones de TNF al mes de evolución y el desarrollo de sibilancias recurrentes .....	107
Figura 28.- Asociación entre las concentraciones de IL17 al mes de evolución y el desarrollo de sibilancias recurrentes .....	108
Figura 29.- Asociación entre las concentraciones de IL10 al mes de evolución y las sibilancias persistentes.....	108
Figura 30.- Relación entre los valores de IL10 al año de evolución en plasma y las sibilancias recurrentes.....	110
Figura 31.- Relación entre las concentraciones de IFN al año en plasma y las sibilancias recurrentes .....	110
Figura 32.- Asociación entre la IL17 al año en plasma y las sibilancias recurrentes .....	110
Figura 33.- Cambios en las concentraciones de IFN, y TNF en plasma en el momento basal, al mes y al año de evolución.....	111
Figura 34.- Patrones de respuesta Th1,Th2 y Th17 en la bronquiolitis por VRS en el momento basal y en la convalecencia.....	113
Figura 35.- Diferencias en los patrones de liberación de citoquinas en lactantes con y sin sibilancias recurrentes tras una bronquiolitis por VRS.	114
Figura 36.- Correlación positiva entre la IL10 en secreciones respiratorias y en plasma basal (pgr/ml).....	117
Figura 37.- Correlación negativa entre la IL6 en secreciones respiratorias y plasma basal. ....	117
Figura 38.- Curva ROC para TNF plasmático a las 4 semanas de evolución..	118
Figura 39.- Curvas ROC para TNF plasmático e IL17 a las 4 semanas de evolución y el número de episodios de sibilancias recurrentes...	119
Figura 40.- Curvas ROC para IL 8 en secreciones y días de O2.....	120
Figura 41.- Hospitalizaciones por bronquiolitis en el Children's medical Hospital en Dallas, Texas(EE.UU) entre 2002 y 2007 .....	124
Figura 42.- Características epidemiológicas de nuestras cohortes históricas de bronquiolitis. ....	130

### **III.- ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1.- Características de la población estudiada .....	81
Tabla 2.- Características de la población estudiada. Pacientes en los que se ha realizado genotipo viral .....	82
Tabla 3.- Análisis filogenético del VRS en las temporadas estudiadas .....	83
Tabla 4.- Concentraciones de citoquinas en plasma (basal) según edad .....	88
Tabla 5.- Concentraciones de citoquinas respiratorias (basal) según edad....	89
Tabla 6.-Concentraciones de citoquinas en plasma (basal).Casos y controles	95
Tabla 7.-Concentraciones de citoquinas en plasma (1mes).Casos y controles	95
Tabla 8.- Relación gravedad/sibilancias recurrentes .....	96
Tabla 9.- Relación edad/sibilancias recurrentes .....	97
Tabla 10.- Relación eosinofilia/ sibilancias recurrentes .....	103
Tabla 11.- Relación IL plasma (basal) / sibilancias recurrentes .....	105
Tabla 12.- Relación IL plasma (1m) / sibilancias recurrentes.....	107
Tabla 13.- Relación IL plasma (1a) / sibilancias recurrentes.....	109
Tabla 14.- Correlaciones entre IL plasma y secreciones respiratorias .....	116

#### **IV.- ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

VRS	Virus Respiratorio Sincitial
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocitos T helper 2
Th0	Linfocitos T helper 0
IFN	Interferón
TNF	Factor de necrosis tumoral
IL	Interleuquina
RANTES	Células T normales expresadas y secretadas por activación
ARN/RNA	Acido ribonucleico
IRVB	Infección respiratoria de vías aéreas bajas
IC	Intervalo de confianza
HPIV3	Virus Parainfluenza 3
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
LTC4	Leucotrieno 4
IG	Inmunoglobulina
TLR	Tol like receptor
RLR	Receptores Rig
NLR	Receptores node like
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pgr/ml	picogramos /mililitro
TCD4	Células T CD4
TCD8	Células T CD8

Tregs	Células T reguladoras
NK	Células natural Killer
MPO	Mieloperoxidasa
UCIP	Unidad de cuidados intensivos pediátricos
VDR	Receptor de la vitamina D
BQ	Bronquiolitis
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa



## *Capítulo 1. Estado del arte*





## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- PERSPECTIVA HISTÓRICA**

El Virus respiratorio sincitial (VRS) se descubrió en 1956 en Washington DC (EEUU), en un grupo de chimpancés que presentaban síntomas similares a los del resfriado común. Morris y colaboradores, recuperaron de uno de esos chimpancés, un agente viral citopático que producía en estos animales coriza, rinorrea y malestar general. Inicialmente, este virus se denominó "Agente productor del coriza de los chimpancés" (CCA). Estos mismos investigadores analizaron toda la colonia de chimpancés y cerca del 100% de ellos estaban infectados por este agente viral. Además, los autores se dieron cuenta de que los cuidadores humanos de esta colonia de chimpancés, presentaban simultáneamente síntomas catarrales y demostraron que estaban infectados por el mismo virus. Estudios posteriores permitieron definir, basándose en la anatomía patológica observada en cultivos celulares y la formación de sincitios característicos un nuevo agente viral, cuyo nombre fue acuñado por Channock y colaboradores en 1957 y a partir de entonces pasó a denominarse "Virus Respiratorio Sincitial". Más tarde, en 1974, Beem y colaboradores describieron por primera vez con detalle durante las epidemias anuales, la epidemiología de la infección por VRS en lactantes. Desde entonces, numerosos autores han abordado la infección por VRS desde diferentes perspectivas y se ha avanzado mucho en el conocimiento de aspectos epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico de esta enfermedad, sin embargo, aún hoy en día, casi 60 años después de la primera descripción de este virus asociado a enfermedad en humanos, existen numerosos aspectos que no están suficientemente aclarados. Así, aún en la actualidad, no disponemos de un tratamiento realmente eficaz frente a esta enfermedad, ni existe ninguna vacuna frente a VRS. Tampoco conocemos por completo, la respuesta inmunológica del organismo frente a este virus, ni hemos podido describir los mecanismos inmunes por los que algunos pacientes desarrollan sibilancias recurrentes postbronquiolitis y otros no <sup>1 2 3 4 5</sup>.

## **1.2.- DEFINICIÓN DE BRONQUIOLITIS**

La bronquiolitis se considera la primera causa de hospitalización en los lactantes en países en vías de desarrollo durante la temporada de invierno, y es además, en estos países una causa importante de morbi-mortalidad <sup>6</sup>. En los países desarrollados, la bronquiolitis es también la primera causa de ingreso hospitalario en los niños menores de dos años de edad y cerca del 100% de los lactantes en EEUU se infectan por este virus en los primeros tres años de vida <sup>5</sup>.

El término bronquiolitis se ha utilizado desde 1940 como diagnóstico de un "complejo de síntomas clínicos respiratorios", aunque inicialmente se desconocía la etiología viral de la enfermedad.

La bronquiolitis, se define como un episodio agudo de obstrucción de la vía aérea inferior producida por un virus en lactantes menores de 24 meses de edad, si bien los criterios diagnósticos varían de un país a otro e incluso dentro de un mismo país, de un centro a otro.

Esta enfermedad se considera un síndrome, requiriendo para su diagnóstico la existencia de los siguientes criterios de carácter clínico (Mc Connachie, 1983) <sup>7</sup>:

- 1- Disnea espiratoria de comienzo agudo.
- 2- Edad inferior o igual a 24 meses.
- 3- Signos de enfermedad respiratoria vírica como coriza, otitis o fiebre.
- 4- Con o sin indicios de distress respiratorio.
- 5- Debe ser el primer episodio

También se considera criterio clínico-radiológico la presencia de hipoxia (saturación de oxígeno <95% determinado por pulsioximetría) e hiperinsuflación en la radiografía de tórax en ausencia de broncoespasmo en un niño de 1 a 24 meses de edad.

El virus respiratorio sincitial (VRS) es la principal causa de patología de las vías aéreas inferiores en niños menores de 2 años, siendo la causa del 70% de los episodios de bronquiolitis, especialmente en sus formas graves.

Su diseminación es tan eficaz, que casi la totalidad de la población ha sido infectada por el VRS en los tres primeros años de la vida. Sin embargo, la inmunidad tras la primoinfección por VRS no es completa, pudiendo observarse con frecuencia reinfecciones a lo largo de la vida que pueden afectar también a niños mayores y adultos, aunque en estas poblaciones se afectan con más frecuencia las vías respiratorias altas <sup>8 9 10</sup>.

Numerosos estudios observacionales han demostrado que aproximadamente el 40%-50% de los niños que han padecido una bronquiolitis por virus respiratorio sincitial (VRS) en los primeros meses de vida, presentan episodios de sibilancias recurrentes o hiperreactividad bronquial durante años. Además, existen numerosas evidencias clínicas, epidemiológicas, y experimentales que sugieren la idea de que el VRS puede inducir y/o provocar episodios de sibilancias durante la lactancia.

La pregunta que nos planteamos es: ¿El VRS produce por sí mismo, a través de una compleja respuesta inflamatoria, sibilancias recurrentes? o bien ¿El VRS selecciona niños genéticamente predispuestos a padecer asma?. Probablemente ambos factores están interrelacionados y contribuyen al desarrollo de esta enfermedad tan compleja y multifactorial como es el asma. Existen numerosas teorías que tratan de explicar los mecanismos por los que el VRS puede producir asma en la lactancia: teorías neurológicas, inmunológicas, persistencia del virus latente en el pulmón, y también parece existir una relación directa entre el grado de eosinofilia en sangre periférica durante el primer ingreso y la tasa de recurrencias posteriores <sup>11 12 13</sup>.

A pesar de ser una enfermedad muy frecuente en la infancia, aún existen muchos aspectos de la patogenia de la enfermedad que no se conocen muy bien, como por ejemplo algunos factores del virus y del huésped que predisponen a padecer una enfermedad grave, así como al desarrollo posterior de sibilancias recurrentes.

### **1.3.- EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL**

#### **1.3.1.- Clasificación taxonómica**

El VRS es un virus ARNm que pertenece a la familia *Paramyxoviridae* que consta de cuatro géneros, de los cuales tres forman la subfamilia *Paramixovirinae* compuesta por los *Paramyxovirus*, que contienen los virus parainfluenza humana tipos 1 y 3; los *Rubulavirus*, que contienen los virus de la parotiditis y parainfluenza humana tipos 2 y 4, y los *Morbilivirus*, representados por el virus del sarampión. La especie VRS pertenece al cuarto género, *Pneumovirus*, de la subfamilia *Pneumovirinae*. Dentro de ese mismo grupo se encuentran los virus de la neumonía murina, similares en morfología y biología, el VRS bovino, el VRS ovino, el VRS caprino y el virus de la rinitis de los pavos.

Entre las propiedades características del VRS está la cantidad y el orden de los genes, así como la ausencia de actividad de hemaglutinina y neuraminidasa.<sup>14</sup>

#### **1.3.2.- Características del virus**

El VRS es un virus de mediano tamaño, (120-300 nm) con envoltura<sup>15</sup>.

Su genoma consiste en una única cadena simple no segmentada de ARN de sentido negativo, asociada a proteínas virales en toda su longitud formando la nucleocápside helicoidal. El hecho de que el VRS sea no segmentado, se considera importante ya que no se va a realizar reordenamiento genético con otros virus, como sucede con los virus gripales<sup>16</sup>.

La envoltura viral es una capa bilipídica derivada de la membrana plasmática de las células huésped y tiene aspecto de cardo, con espículas superficiales formadas por glicoproteínas transmembrana de unos 11-12 nm de longitud y separadas por 6-10 nm. Utilizando microscopía electrónica de cortes ultrafinos de tejidos infectados, se observa al VRS como una partícula pleomorfa redonda o filamentosa que brota de la membrana citoplasmática celular, rodeada por proyecciones glucoproteicas (Figura1).

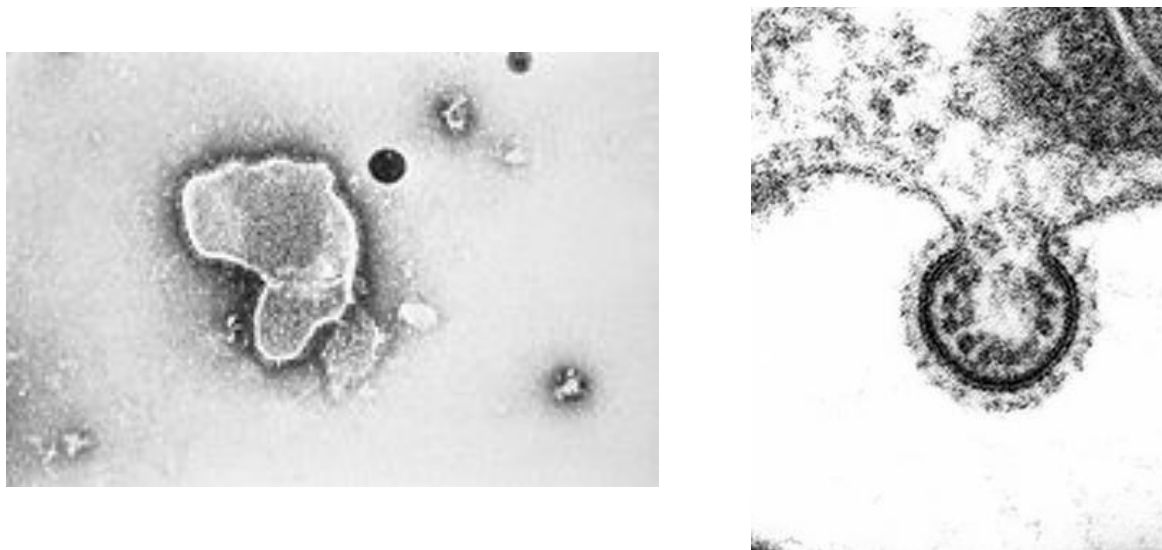


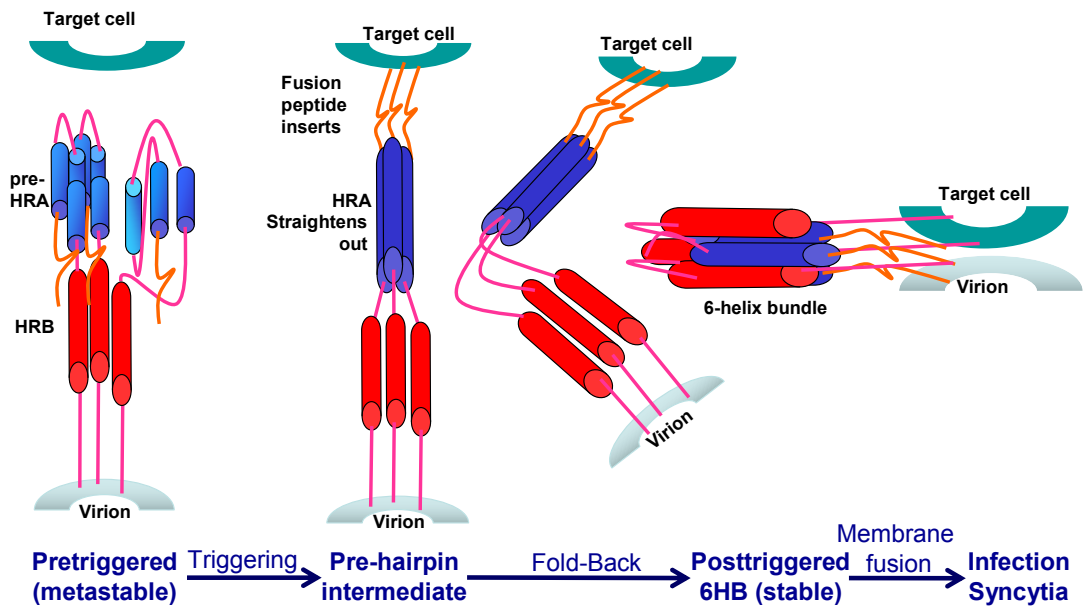
Figura 1.- Imágenes microscópicas del VRS. Ultraestructura del VRS.

Hasta el momento, se han podido determinar 10 proteínas virales esenciales y se ha descrito la secuencia completa de los genes de las cepas A29,26. El ARN viral consta de 15.222 nucleótidos transcritos en 10 ARN-mensajeros poliadenilados monocistrónicos, cada uno de los cuales codifica una cadena polipeptídica importante. Tres de las proteínas -N, P y L- se asocian con la nucleocápside. Tres de las cinco proteínas asociadas con la envoltura -F, G y SH- son proteínas de superficie transmembrana glucosiladas, y las otras dos -M y M2- son proteínas no glucosiladas de la matriz. Las dos proteínas restantes, NS1 y NS2, son proteínas no estructurales del virión.

Entre las proteínas estructurales, las proteínas G y F, asociadas a la envoltura, son los mayores determinantes antigénicos del virus e inducen la formación de anticuerpos neutralizantes. La proteína G media la adhesión del virus a las células epiteliales y se relaciona con una respuesta inmunológica predominantemente Th2, mientras que la proteína F es la responsable de la entrada del virus, la inserción del RNA en las células del huésped y la formación de los sincitios característicos. Se cree que la proteína F induce una respuesta inmune Th1 predominante <sup>17 18 19</sup>.

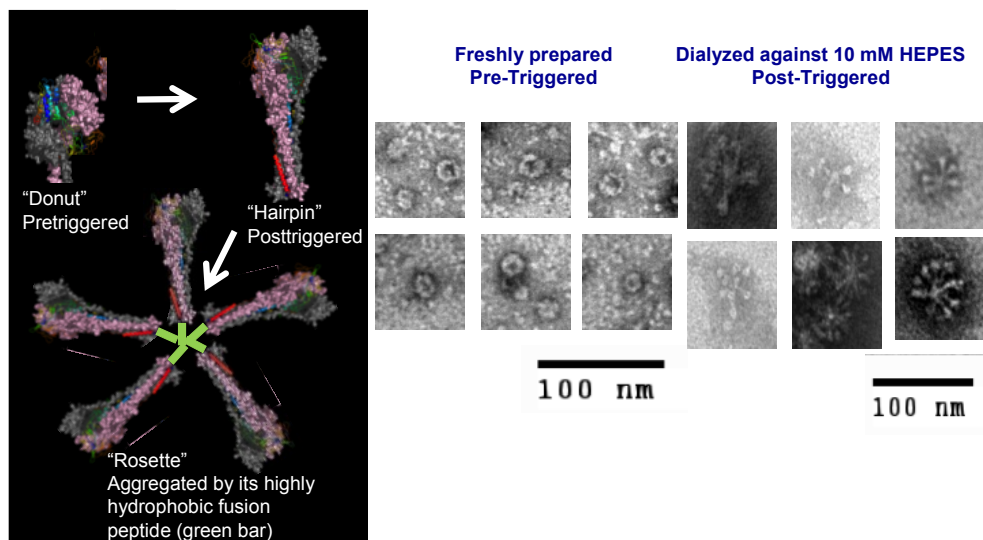
**La proteína F** es estructuralmente muy similar a otras proteínas F de otros *Paramyxoviridae*, en lo que respecta a la localización de los dominios hidrofóbicos y los residuos de cisteína, así como a la activación proteolítica que produce la exposición del péptido hidrofóbico de fusión. La proteína F del VRS se encuentra accesible en la superficie del virus, es una de las proteínas mas activas de este virus y juega un papel muy importante en la formación de los sincitios característicos y desde siempre ha sido el target preferido para el desarrollo de drogas antivirales. La proteína F debe combinar actividades de fusión y adhesión en la membrana y esto es suficiente para producir la infección del epitelio respiratorio <sup>20</sup>.

Como otras proteínas de fusión de la clase I, la proteína F es un "trimer" y esta compuesta por una proteína F2 N-terminal unida por uno ó probablemente dos puentes disulfuro a la proteína F1 transmembrana. Esta forma de la proteína F es totalmente activa y capaz de causar la fusión celular. Así, inicialmente, la proteína F del VRS es una forma meta-estable "pre-trigger", una vez que es activada se producen una serie de cambios importantes e irreversibles que afectan especialmente a la región helicoidal « HRA », donde se inserta el péptido de fusión en la célula "target". M. Peeples y colaboradores, recientemente, han sido capaces de aislar la forma completa "pre-trigger" de la proteína F que tiene una forma esférica, y la forma "post-trigger" de la proteína, que adquiere una forma de roseta característica <sup>21</sup> (Figuras 2 y 3).



Courtesy of Dr. Mark Peeples

Figura 2.- Estructura de la proteína F de superficie del VRS. Transformación de la forma "pre-trigger" y "post trigger".



Chaiwatpongsakorn et al., J. Virol, 2011

Figura 3.- Formas "pre y post-trigger" de la proteína F <sup>21</sup>.

Es importante conocer mejor la estructura de la proteína F del VRS porque esto facilitará el desarrollo de nuevos agentes antivirales y de vacunas anti VRS <sup>21</sup>.

**La proteína G**, en contraste con la proteína F, no es estructuralmente similar a las proteínas H (hemaglutinina) y HN (Hemaglutinin-neuraminidasa). Los receptores específicos para VRS no se conocen bien, si embargo, los glicosaminoglicanos de superficie celular (GAGs) y en concreto, los heparan sulfatos, son muy importantes para la infección. Tanto la proteína F como la G son capaces de ligar los GAGs contribuyendo así a la unión celular.

Aunque son numerosos los mecanismos por los que la respuesta inmune puede ser alterada frente al VRS, recientemente está cobrando importancia el papel de la proteína G en estos cambios inmunológicos. La atención se ha focalizado en la región CX3C que tiene una inmunogenicidad muy baja. Los estudios se dirigen hacia la proteína G como target para intervenciones terapéuticas para reducir la morbilidad del VRS a corto y medio plazo. Así, la proteína G se ha convertido en un target muy prometedor para la terapia frente a VRS, ya que está involucrada en la respuesta inmune innata. En modelos experimentales en ratones, un Anticuerpo (Ac) monoclonal frente a la proteína G del VRS demostró ser eficaz frente a la infección y disminuyó la carga viral. Recientemente, se ha descrito una alta afinidad del Ac monoclonal frente al epítipo K de la proteína G del VRS y se supone que estos datos podrán tener aplicaciones clínicas en los próximos años. De hecho, se considera que una estrategia vacunal podría ser la neutralización de la proteína G <sup>22</sup>.

La subunidad F2 de la proteína F, es responsable de la infección específica de especie mientras que la proteína G no está involucrada en la especificidad de la infección por VRS. Así, solamente la subunidad F2, es responsable de la especificidad de la infección por VRS. Esto hace a la proteína F muy similar a las "proteínas espiculadas" de otros virus que requieren receptores específicos para la adhesión y la fusión, como por ejemplo el VIH o el virus influenza y la hemaglutinina. La reciente identificación de F2 como el acompañante necesario de la entrada específica de VRS debería facilitar la identificación de



otros receptores y aportar las bases del desarrollo de herramientas específicas que interfieran con la infección de este virus y que sean eficaces en el tratamiento de esta enfermedad<sup>20 23 24 25 26 27 28</sup>.

Existen dos subtipos de VRS, A y B, que pueden circular simultáneamente en la comunidad durante el invierno. Los análisis antigénicos y moleculares de las relaciones entre las cepas que circulan al mismo tiempo en un mismo medio y en varias regiones del mundo señalan que las cepas dentro de cada grupo tienen diversidad genética. Incluso en 15 regiones geográficas muy distintas, las cepas que circulan juntas en un mismo brote pueden tener genotipos similares y linajes evolutivos paralelos. Aún no está claro cual de los dos subgrupos es más virulento. Algunos estudios señalan una mayor gravedad en las infecciones asociadas al VRS del grupo A, al menos en lactantes, si bien las implicaciones epidemiológicas y clínicas de las diferentes secuencias nucleotídicas no han sido por el momento aclaradas convenientemente<sup>29</sup>.

Los Anticuerpos anti-proteína F confieren protección frente a los dos tipos del virus ( A y B), sin embargo los anticuerpos frente a la proteína G no suelen proteger frente a ambos ya que solamente hay un 35% de similitud entre las proteínas G de ambos virus. Por ello la proteína F se considera una diana terapéutica<sup>18 29</sup>.

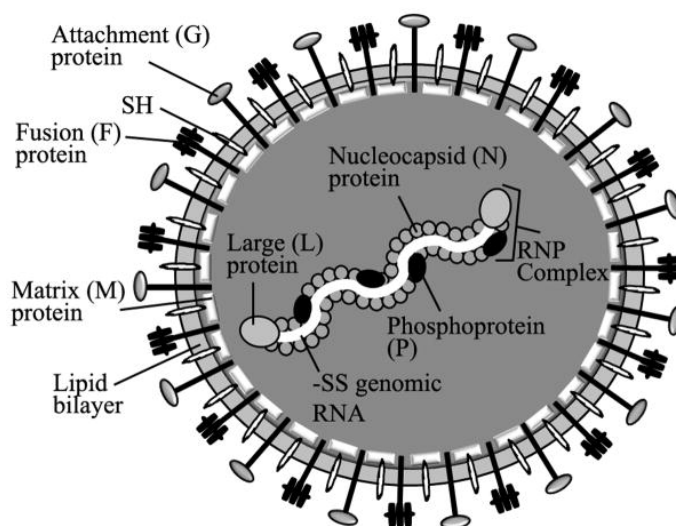


Figura 4.- Estructura del VRS

Tomado de Empey KM, et al. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1258-67<sup>30</sup>.

### **1.3.3.- El ciclo de la replicación viral**

La fusión y la adhesión del virus están mediadas por las proteínas F y G. La entrada ocurre gracias a la fusión de la cubierta del virus con la membrana de la célula plasmática. La transcripción del genoma y la replicación ocurren en el citoplasma simultáneamente y 4-6 horas después de la inoculación del virus ya se detecta RNAm y proteínas del VRS a nivel intracelular. Las células así infectadas desarrollan cuerpos de inclusión citoplasmáticos que se hacen visibles tan pronto como a las 12 horas de la infección <sup>31 32</sup>.

Se cree que los cuerpos de inclusión son lugares donde se sintetiza el RNAm, aunque mas recientemente se ha demostrado que los cuerpos de inclusión son capaces de inhibir la respuesta celular frente a la infección <sup>32</sup>.

### **1.3.4.- Mutaciones espontáneas**

El VRS tiene un índice muy alto de sustituciones de nucleótidos como ocurre en todos los virus RNA. Las deleciones espontaneas de los genes G y SH se han descrito in vitro, en tanto que las deleciones de la mayoría de los genes de la proteína G ocurren in vivo <sup>33</sup>.

El VRS circulante va acumulando cambios progresivos en su secuencia y en su antigenicidad como respuesta a la presión inmune, empezando en su proteína G, pero es un proceso muy lento que ocurre a lo largo de décadas.

### **1.3.5.- El tropismo del virus**

In vivo, el VRS se puede recuperar de las células superficiales del epitelio respiratorio. El VRS suele estar recubierto de abundantes secreciones respiratorias nasofaríngeas, pero este virus también se ha recuperado de células epiteliales de la tráquea, de los bronquios, y de los bronquiolos. Ambos tipos de neumocitos, I y II se pueden infectar y el VRS se detecta también en sangre, en líquido cefalorraquídeo, en miocardio y en leucocitos mononucleares <sup>34 35</sup>.

Hasta ahora se creía que recuperar el VRS a nivel extra pulmonar era difícil y solamente ocurriría en individuos inmunocomprometidos o en animales de experimentación, sin embargo, recientemente en una serie de pacientes estudiados en Dallas y en Columbus por la Dra Mejías y colaboradores, se ha conseguido recuperar el VRS en riñón, cerebro y en otras localizaciones extra pulmonares en autopsias de niños fallecidos por esta enfermedad, algunos de los cuales no tenían ninguna inmunodepresión <sup>34</sup>.

#### **1.4.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD**

La infección respiratoria de las vías bajas (IRVB) es la causa principal de morbilidad y mortalidad en la infancia. El virus respiratorio sincitial (VRS) es el patógeno que mas frecuentemente produce IRVB en lactantes <sup>36</sup>.

Un metanálisis reciente, sugiere que el VRS causa más de 34 millones de infecciones respiratorias en niños menores de 5 años, de los que al menos 3,5 millones de casos necesitan ingreso hospitalario y entre 66.000 y 199.000 niños mueren cada año en países subdesarrollados o en vías de desarrollo por esta enfermedad <sup>14</sup>. En Estados Unidos, el VRS es la primera causa de hospitalización en lactantes, con un rango de hospitalización de 2350/ 100.000 (95% IC, 2220-2520). Un estudio multicéntrico español publicado en 2010, demuestra de que el 51,7% de todos los primeros episodios de bronquiolitis en niños  $\leq 2$  años de edad fueron atendidos en algún servicio de urgencias. En otro estudio realizado en España en 2003, encontramos que la bronquiolitis es la responsable del ingreso hospitalario de 37 por 1.000 lactantes menores de 6 meses y de 25 por 1.000 si se consideran a los menores de 12 meses, un 5-16% de ellos, a su vez, requerirán ingreso en la unidad de cuidados intensivos pediátricos. La estancia media hospitalaria en España es de 5,7 días y la tasa de mortalidad intrahospitalaria de 3,4 por cada 100 mil menores de 2 años <sup>37</sup> <sup>38</sup> <sup>39</sup>. El VRS es responsable de hasta el 70-80% de los casos diagnosticados de bronquiolitis <sup>29</sup> <sup>40</sup> <sup>41</sup> y aunque la mayoría de los pacientes presentan una enfermedad aguda y recortada en el tiempo, aproximadamente el 40%-50% de los pacientes desarrolla posteriormente episodios de sibilancias recurrentes.

El desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas basadas en técnicas de diagnóstico molecular, ha mejorado nuestra capacidad para detectar virus en las muestras respiratorias y por lo tanto se pueden identificar mejor los agentes causales de la infección <sup>20 42</sup>. Utilizando estos métodos, algunos investigadores han conseguido identificar algún virus como agente causal de las bronquiolitis, hasta en el 90% de los casos.

En los lactantes hospitalizados, el VRS es la causa mas frecuente de bronquiolitis en invierno, pero se aíslan otros virus hasta en el 47% de estos lactantes <sup>29</sup>. Estos estudios confirman que el VRS es el agente etiológico mas frecuentemente implicado, hasta en el 45% de los casos, aunque también es el segundo agente causal como copatógeno en el 20% de los casos, seguido de rinovirus, metapneumovirus humano y adenovirus como patógenos aislados. Aunque las características clínicas son similares, la estacionalidad de estos patógenos es diferente <sup>43 44 45 46</sup>.

En general, el pico de máxima incidencia de las bronquiolitis ocurre entre los 2 y los 6 meses de edad, aunque la edad de máxima incidencia varía dependiendo del agente etiológico. Además, mientras que las epidemias debidas al VRS ocurren cada año en invierno en las zonas templadas de la tierra, el VRS se aísla durante todo el año en climas húmedos y muy cálidos <sup>47</sup>. En climas templados, el VRS causa epidemias en la comunidad durante el otoño, invierno y el inicio de la primavera, generalmente entre los meses de noviembre a mayo en el hemisferio norte y de marzo a octubre en el hemisferio sur. Sin embargo, cada año es muy variable el inicio y la duración de la epidemia. En USA, los servicios de vigilancia epidemiológica en un periodo de 10 años, demuestran que las epidemias comienzan a principios de noviembre y finalizan a finales de enero en la mayoría de los estados <sup>48</sup>. Sin embargo, existen diferencias entre las distintas regiones, así en Florida aparece el VRS tan temprano como en el mes de julio en Miami y en el norte de Florida en octubre <sup>48 49</sup>. La duración de las epidemias, generalmente es de 12 a 20 semanas aproximadamente, aunque puede durar mucho mas, especialmente en las regiones mas al sur. En regiones tropicales, próximas al Ecuador se puede detectar el VRS durante todos los meses del año.

Los brotes epidémicos de bronquiolitis que ocurren en primavera son debidos por lo general al metapneumovirus humano, y aparecen uno o dos meses tras la epidemia de VRS.

El virus parainfluenza 3 (HPIV-3) es responsable de hasta el 15% de los casos de esta infección y los brotes epidémicos aparecen en primavera y verano. Tanto el rinovirus como el bocavirus humano, parece que producen infección durante todo el año, al igual que los adenovirus que causan ocasionalmente cuadros de bronquiolitis sin un patrón estacional muy definido <sup>50 51</sup>.

La prevalencia de coinfecciones en la bronquiolitis, se estima en torno al 30% en lactantes pequeños con infección respiratoria ingresados en el hospital o valorados en los servicios de urgencias pediátricas <sup>50 51 52 53</sup>.

Actualmente, desconocemos si la infección por varios virus representa o no una mayor gravedad de la enfermedad. Así, un estudio piloto en Inglaterra sugiere que la coinfección por VRS y metapneumovirus humano produce un aumento de 10 veces el riesgo de ingreso en Cuidados Intensivos, y otro estudio multicéntrico en USA en lactantes hospitalizados sugiere que la coinfección por VRS y rinovirus prolonga la estancia media de los pacientes ingresados <sup>54 55 56 57</sup>. En España, en 2001 García ML y colaboradores publicaron sobre un total de 617 lactantes ingresados por infección viral respiratoria, que en el 83,6% de estos pacientes se aisló VRS, y que las tasas de coinfección fueron en torno al 6,2% en los pacientes en los que se aisló VRS <sup>58</sup>. En cualquier caso, se necesitan más estudios para dilucidar la importancia de la coinfección en la gravedad y evolución de esta infección.

### **1.5.- PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD**

En la mayoría de los estudios existentes, se considera que el período de incubación de la bronquiolitis por VRS es de 5 días con un rango de 2-8 días <sup>6</sup> <sup>59</sup>. En los niños hospitalizados por esta enfermedad, el VRS se elimina en grandes cantidades durante un periodo de unos 21 días <sup>6</sup>.

La infección se transmite de persona a persona por la vía aérea, o mediante auto-inoculación a partir de superficies contaminadas. La vía de entrada del virus suele ser a través de la nariz o los ojos, mientras que la boca es una vía de inoculación mucho menos sensible. Los aerosoles no se consideran una vía importante de difusión, al ser poco estable el virus en suspensión.

Por regla general, la infección por VRS se limita a las vías respiratorias, diseminándose de las vías respiratorias altas a las bajas. Una vez que el virus penetra en las células del epitelio mucoso respiratorio, se produce la replicación viral pasando el virión rápidamente de célula a célula y más tarde a la sangre (viremia).

La respuesta inmune primaria frente a la infección por VRS es pobre e incompleta, lo que explica por qué las reinfecciones son tan comunes a lo largo de la infancia, a pesar de tener títulos altos de anticuerpos neutralizantes.

El VRS no se replica normalmente fuera del tracto respiratorio superior, por lo que la infección generalmente, queda localizada en la mucosa respiratoria, pero hay ciertos estados de inmunosupresión que permiten la aparición de viremia y manifestaciones extra pulmonares. Actualmente se cree que incluso en niños previamente sanos pero con enfermedad muy grave, el VRS puede encontrarse fuera del tracto respiratorio <sup>34</sup>.

La sintomatología clínica de esta infección se explica por un lado por el efecto citopático directo del virus y por otro por la respuesta inmune del huésped. La mayoría de los pacientes con bronquiolitis presentan signos histológicos de recuperación dentro de la primera semana de enfermedad, pudiendo persistir indefinidamente otras alteraciones morfológicas. El epitelio inflamado y denudado por la primera infección por VRS es terreno predispuesto para futuras reinfecciones víricas, de menor gravedad, pero que cursan con disnea por irritación de los receptores vagales que se encuentran al descubierto <sup>60 61</sup>.

### 1.5.1.- Factores de riesgo en la bronquiolitis VRS

**La edad y el sexo** son factores de riesgo de gravedad de la enfermedad, siendo los lactantes mas pequeños y los ancianos, dos grupos de alto riesgo para la infección por VRS <sup>62</sup>. Se estima que aproximadamente entre el 10 y el 28% de los lactantes ingresados por bronquiolitis por VRS son menores de 6 semanas de edad y el 50-70% de los ingresados tienen menos de 6 meses de edad <sup>63</sup>. El sexo masculino es también un factor de riesgo de gravedad del VRS, con una ratio para el riesgo de 1,425:1 entre varones/mujeres <sup>6 15 16</sup>.

En los ancianos con infección por VRS, la gravedad depende sobre todo de las enfermedades de base, de hecho aproximadamente el 80% de los ancianos hospitalizados por esta infección tienen enfermedades cardiopulmonares de base. Se ha aislado el VRS en el 11% de los ancianos ingresados por neumonía, en el 11% de los EPOC , en el 5% de los ingresados por insuficiencia cardiaca y en el 7% de los ancianos diagnosticados de asma <sup>64</sup>.

**Las enfermedades de base** como la prematuridad, se consideran factores de riesgo y estos lactantes tienen mayor riesgo de hospitalización que los demás. Este riesgo de hospitalización se cifra entre el 4 y el 14% aproximadamente, dependiendo de la edad gestacional<sup>65</sup>. Los lactantes con enfermedades pulmonares como la fibrosis quística se consideran también pacientes de riesgo para la infección por VRS <sup>66</sup>. Las tasas de hospitalización por VRS en niños con Síndrome de Down están entre 7-11% dependiendo de la cardiopatía acompañante<sup>67</sup>. En todos estos pacientes, se considera que la enfermedad por VRS es mas grave, con mas ingresos en UCIP, mas días de oxígeno, y mayor estancia media, sin embargo, mas del 50% de los niños ingresados en nuestros hospitales por bronquiolitis por VRS son lactantes sin enfermedades de base <sup>68</sup>.

**Los pacientes inmunodeprimidos** pueden tener una enfermedad similar a la que se presenta en lactantes previamente sanos, sin embargo, ellos tienen mayor riesgo de complicaciones y muerte. Se considera que los niños

receptores de trasplante de medula ósea son pacientes de alto riesgo, especialmente en el post-trasplante y en el caso de presentar una enfermedad injerto contra huésped, de manera que aproximadamente un 50% de las infecciones por VRS en estos niños progresan a enfermedad de la vía aérea inferior y entre un 6 y un 80% de ellos el VRS puede producir la muerte <sup>69</sup>  
<sup>70</sup>.

**Los pacientes con trasplante de pulmón** tienen un riesgo mayor de muerte por esta enfermedad, que se cifra entre un 10 y un 15% y un riesgo muy elevado de desarrollar bronquiolitis obliterante <sup>71</sup>.

La infección por VRS en pacientes **infectados por VIH** es más prolongada que en lactantes sanos, pero no mas grave.

**Otros factores de riesgo** que condicionan la gravedad de la bronquiolitis por VRS son, por ejemplo, la altitud por encima de 2.500 metros, donde se objetiva un riesgo mayor de hospitalizaciones, quizás porque estos niños tienen saturaciones de oxígeno basales menores debido a la altitud <sup>72</sup>. La malnutrición condiciona la gravedad de la enfermedad, así los lactantes de 6 semanas con peso y talla por debajo del Percentil 3 tienen mas riesgo de hospitalización y de hipoxemia que los que tienen un estado nutricional adecuado para su edad.

La asistencia a guardería, así como tener varios hermanos en edad escolar, también se consideran factores de riesgo para la infección por VRS <sup>73</sup>.

En el **estudio FLIP**, realizado en España en 2008 y cuyo objetivo principal era desarrollar un modelo validado basado en los factores de riesgo para predecir la hospitalización relacionada con VRS en prematuros nacidos con una edad gestacional de 33-35 semanas, se demostró que solamente la existencia de hermanos en edad escolar y la presencia de más de cuatro convivientes en el domicilio familiar eran factores de riesgo para la hospitalización por esta infección <sup>74 75</sup>.



Los partos múltiples también se relacionan con un mayor riesgo de hospitalización por VRS y una mayor gravedad <sup>76</sup>.

El tabaquismo materno parece que puede contribuir a una enfermedad mas grave del tracto respiratorio inferior aunque no está claro si el riesgo de hospitalización esta aumentado.

## **1.6.- LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD**

La mayoría de los lactantes ingresados en los hospitales durante cada epidemia de bronquiolitis debida a VRS, son lactantes previamente sanos, sin enfermedades de base. Actualmente es imposible prever la evolución de estos pacientes. En el momento del ingreso es imposible saber cuales de estos lactantes infectados por VRS van a ser dados de alta en las siguientes 24 o 48 horas y cuales de ellos van a empeorar y van a necesitar soporte ventilatorio en las siguientes días del ingreso.

Seria importante encontrar algún marcador precoz de gravedad, que nos permitiera saber de antemano, que pacientes van a desarrollar una infección grave por VRS y que pacientes no <sup>68</sup>.

### **1.6.1.- El huésped, la respuesta inmune y la gravedad**

Los estudios publicados así como la práctica clínica diaria, demuestran que existe una gran variabilidad en la gravedad de la enfermedad en los niños ingresados por bronquiolitis por VRS <sup>77 78 79</sup>. Se han intentado identificar marcadores de riesgo y marcadores pronósticos de gravedad como las citoquinas, sin resultados concluyentes. Además, hoy por hoy tampoco existen marcadores que nos permitan predecir la evolución a medio plazo de la enfermedad, es decir, poder concretar en fases tempranas, que pacientes van a desarrollar sibilancias recurrentes y cuales otros no <sup>80</sup>.

Se ha propuesto que es la combinación de factores del huesped y de la respuesta inmune y factores del virus <sup>81</sup> los que con toda probabilidad contribuyen a determinar la gravedad y la evolución de la enfermedad.

-Numerosos estudios han tratado de explicar, una correlación entre la carga viral y la gravedad de la infección <sup>82 83 84</sup>, y la mayoría de ellos no han identificado dicha relación, si bien algunos encontraron relación entre ambos parámetros.

-La relación entre los distintos subtipos del VRS A y B <sup>85</sup>, así como los distintos genotipos virales y la gravedad de la infección también han sido analizados y mientras algunos estudios encuentran relación entre la gravedad de la enfermedad y el subtipo A, otros no han conseguido confirmar estos hallazgos <sup>19</sup>.

-La importancia de la respuesta inmune innata en la patogenia de la bronquiolitis grave se esta empezando a estudiar. Los primeros estudios demostraron una respuesta inflamatoria importante en la vía aérea de los lactantes con bronquiolitis, con producción de citoquinas proinflamatorias y citoquinas como TNF alfa, IL-6, IL-8, MIP-1α e IFN-γ. Mas recientemente, algunos investigadores han encontrado concentraciones disminuidas de citoquinas inflamatorias y otros marcadores de lesión celular, como la LDH en el tracto respiratorio de las formas mas graves de la infección por VRS <sup>86</sup>. Estas observaciones sugieren que una respuesta inmune mas débil, se asocia con una mayor gravedad de la enfermedad <sup>80 87 88 89 90</sup>.

-El grupo de Ramilo, Mejías y Hall en Columbus (Ohio), han caracterizado la respuesta inmune funcional en una cohorte de 66 niños previamente sanos, ingresados con el primer episodio de bronquiolitis por VRS, en la estación 2010-2011. Encontraron que las IL6, 8 y 19 estaban ligeramente elevadas en el plasma de los lactantes con bronquiolitis comparado con los controles sanos, independientemente de la gravedad de la infección.

Por otro lado aquellos lactantes que precisaron ingreso en UCIP, tuvieron una menor producción de TNF- $\alpha$  comparado con los lactantes ingresados en planta y con los controles sanos. Así, la producción disminuida de TNF- $\alpha$  predice una estancia media más larga, independientemente de la edad, el sexo, la presencia de fiebre y de la carga viral<sup>79 80</sup>.

La pregunta que se plantea es si los niños que desarrollan bronquiolitis grave nacen ya con un sistema inmunológico afectado o si es el VRS el que produce esta inmunosupresión<sup>90</sup>.

Conviene recordar, que la mayoría de los niños que ingresan en los hospitales por bronquiolitis por VRS son lactantes previamente sanos, sin factores de riesgo. De estos pacientes que ingresan, se estima que aproximadamente un 10-20% desarrollaran una enfermedad grave y necesitaran ingreso en las Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos. Actualmente, se cree que la inmunidad innata juega un papel decisivo en la patogenia de la enfermedad grave. Algunos autores han publicado, que en las unidades de críticos, los pacientes ingresados con sepsis bacteriana presentan una hiporrespuesta de la inmunidad innata que se traduce en una disminución del TNF- $\alpha$  y una evolución clínica peor. Cesar Mella et al postulan que si en los niños con infección grave por VRS la inmunidad innata está alterada, estos tendrán disminuida en sangre los mediadores inflamatorios propios de la respuesta inmune innata. Así, realizaron un estudio en niños con infección grave por VRS en lactantes críticamente enfermos e ingresados en la UCIP<sup>90 91</sup>, demostrando que en este subgrupo de pacientes, las concentraciones séricas de citoquinas pro inflamatorias sufrían aumentos leves comparadas con las concentraciones de estas citoquinas en niños con enfermedad mas leve, ingresados en planta de hospitalización.

Esta disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, fue documentada a las 24 horas del ingreso, por lo que no parece deberse a cambios asociados al manejo terapéutico recibido en la UCIP.

La disfunción de la inmunidad innata se ha relacionado con la mala evolución en las sepsis de origen bacteriano, con los síndromes de fallo multiorgánico y con los traumatismos graves.

Este grupo de investigadores, sugiere que en las formas mas graves de la infección por VRS podría ocurrir un cierto grado de inmunosupresión o "inmunoparálisis", que empeoraría incluso más con la adición de corticoides al tratamiento. Así si estos datos se confirman sería posible identificar a los pacientes de alto riesgo al inicio del cuadro clínico <sup>90 91</sup>.

-Actualmente somos capaces de analizar los perfiles de transcripción genética de la respuesta del huésped frente a la enfermedad por VRS, y esto nos proporciona una nueva herramienta para investigar más sobre la patogenia de la enfermedad. Desde este punto de vista, también se sugiere una respuesta inmune afectada en las formas mas graves de la enfermedad. Además, con esta nueva aproximación diagnóstica, también se pueden correlacionar los datos genómicos con la gravedad de la infección. De hecho, el grupo de Ramilo, Mejías y Chaussabel han desarrollado un score de gravedad denominado "score genómico" que es capaz de correlacionar la respuesta medida a través de los perfiles de transcripción genética o microarrays, con los parámetros clínicos de gravedad como la estancia media, los días que el paciente precisa oxígeno y la gravedad de la infección <sup>92 91</sup>.

### **1.6.2.- Susceptibilidad genética a la bronquiolitis**

Existe un gran interés en conocer los determinantes genéticos que predisponen a padecer enfermedad grave por VRS, aunque es bien conocido que los factores virales y ambientales también pueden jugar un papel importante en la gravedad de la enfermedad. En las últimas décadas, la mayoría de los estudios sugieren, que cambios en algunos loci específicos pueden conferir susceptibilidad para producir enfermedad mas grave por VRS. Algunos genes de respuesta del huesped, involucrados en la enfermedad por VRS son las Proteína A y D del surfactante, el toll like receptor 4 (TLR4) <sup>93 94</sup>, el factor de necrosis tumoral (TNF), las interleuquinas (IL), IL-4, IL-9, IL-10, IL-8, IL-13, y los RANTES. En Holanda, Janssen <sup>95 96 97 98</sup> y colaboradores, realizaron un estudio del genotipado, para tratar de identificar nuevos genes y nuevas vías biológicas que puedan contribuir a la susceptibilidad a padecer

una enfermedad mas grave. Así, ellos determinaron que la susceptibilidad genética frente a VRS, se asocia con los genes de la inmunidad innata, y describieron 22 polimorfismos de nucleótidos en 21 genes que se asociaron de forma estadísticamente significativa con la gravedad de la enfermedad. Los polimorfismos asociados con gravedad de la enfermedad, incluyen los genes del receptor de la vitamina D (VDR), la molécula Jun (JUN), el IFN A5(involucrado en la respuesta temprana de citoquinas frente a la infección), la Oxido nítrico sintetasa (NOS2A) y los receptores de alta afinidad del receptor de IGE, importantes en la unión de la IGE a los mastocitos, basófilos, células dendríticas y otras células inmunes. Estos hallazgos abren una puerta para el futuro estudio de análisis genéticos, determinación de haplotipos, y estudios funcionales para predecir la gravedad de la enfermedad <sup>93 94 95 97</sup>.

Algunos polimorfismos genéticos de la IL8 se han relacionado con bronquiolitis más grave en lactantes sin otros factores de riesgo. Además, los polimorfismos de las IL4, IL 10, IL13, CX3Cr1 y de las proteínas del surfactante A y D se han sugerido como factores que determinan la susceptibilidad frente a la gravedad de la enfermedad; estas observaciones, indican que los factores genéticos, o mejor, inmunogenéticos, juegan un papel importante en la gravedad de la bronquiolitis. Thomsen y colaboradores llevaron a cabo un estudio en Dinamarca, en hermanos gemelos nacidos entre 1998 y 2003. Sus datos sugieren que la contribución de los factores genéticos a la gravedad de la enfermedad, se explica en un 73% por factores ambientales, pero que hasta en un 22% de los casos, la gravedad de la bronquiolitis se puede atribuir a factores genéticos <sup>96</sup>.

No hay que olvidar sin embargo, que los factores ambientales pre y postnatales pueden desempeñar un papel importante en el curso de la infección <sup>93 95</sup>.

### **1.6.3.- Tipos de VRS y gravedad de la bronquiolitis**

EL VRS se divide en dos subgrupos, A y B en relación a su reacción frente a los anticuerpos monoclonales. Estos subgrupos, son diferentes en lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos, y se encuentran las mayores diferencias a nivel de la proteína G de adhesión.

La influencia de los subtipos virales en la gravedad de la infección, no está clara en la actualidad. Bermejo et al publican en 2008 el perfil de 27 mediadores inmunológicos en aspirados nasales en lactantes ingresados por bronquiolitis debida a VRS demostrando que dicho perfil en secreciones respiratorias, es muy similar en ambos subgrupos A y B con elevación de citoquinas y quemocinas de las respuestas inmunes Th1 y Th2 en ambos casos<sup>99 100 101 102</sup>. La mayoría de los autores, sugieren una mayor gravedad de la bronquiolitis cuando ésta es debida a VRS A, si bien aún hoy en día, este hecho no se ha podido demostrar.

### **1.6.4.- Vitamina D y gravedad de la bronquiolitis**

Las concentraciones séricas de vitamina D en sangre, no solo se relacionan con el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis, sino también con la gravedad de la enfermedad en el momento agudo.

En un estudio realizado en Holanda por Belderbos y cols en 2011, se observó que el déficit de vitamina D en la sangre de cordón umbilical de 156 neonatos sanos, se asociaba con un riesgo elevado de bronquiolitis grave por VRS en el primer año de vida<sup>103 104 105 106</sup>.

Janssen demostró también en 2007, que ciertos polimorfismos de los receptores de la vitamina D se asocian con infección grave por VRS, y además *in vitro*, la vitamina D atenúa la inflamación inducida por VRS, sin afectar al aclaramiento viral<sup>103 104 105 106</sup>.

## 1.7.- DE LA BRONQUIOLITIS POR VRS AL ASMA

Aproximadamente la mitad de los pacientes ingresados por bronquiolitis por VRS, van a desarrollar en el siguiente año, después del ingreso hospitalario, sibilancias recurrentes postbronquiolitis. La mayoría de los expertos, tratan de explicar las teorías gracias a las cuales el VRS es capaz de desarrollar hiperreactividad bronquial y sibilancias recurrentes.

Lo cierto es que en el momento actual, aún no somos capaces de predecir que lactantes van a desarrollar sibilancias recurrentes y que niños no lo harán.

Por ello, describir alguna herramienta útil, para poder saber de antemano que pacientes tendrán cuadros repetidos de sibilancias recurrentes, y que pacientes no, sería de gran ayuda en la práctica clínica diaria.

### 1.7.1.- El asma del lactante

El asma es la más común de las enfermedades crónicas en la infancia, afectando a unos 155 millones de individuos en el mundo. En la mayoría de los casos, los síntomas asmáticos aparecen en los primeros años de la vida y en los pacientes adultos con síntomas asmáticos, los síntomas y las alteraciones en la función pulmonar están presentes ya en la primera década de la vida, en particular, antes de los 3 años de edad <sup>107 108</sup>.

El asma bronquial, es entonces, un problema médico importante en todo el mundo y la enfermedad crónica más frecuente entre los pacientes pediátricos y conlleva un costoso tratamiento y un elevado absentismo escolar. Dado su carácter recurrente, su evolución a la cronicidad y su elevada morbilidad tiene un gran impacto sobre el niño y su familia <sup>108</sup>.

El último consenso internacional pediátrico nos da la siguiente definición sobre asma del lactante:

“Se habla de **asma del lactante**, cuando se producen tres o más episodios de sibilancias y/o tos (el primero de ellos antes de los 12 meses de edad) en un marco clínico en el que el diagnóstico de asma sea el más probable,

y se hayan excluido otros diagnósticos menos frecuentes. No se ha podido incluir el concepto de inflamación eosinófilica de las vías aéreas, debido a que no se dispone de información suficiente de su presencia en los niños pequeños con asma leve y moderada”.

El GINA (Global Initiative for Asthma Consenso Internacional) describe dos patrones de asma en la infancia, probablemente con distinto mecanismo patogénico:

1- Niños con episodios recurrentes de sibilancias asociados a infecciones respiratorias víricas, a menudo después de un primer episodio de bronquiolitis, que aparecen en pacientes sin antecedentes familiares o personales de atopia. En ellos, suele disminuir la sintomatología en años sucesivos y no existe evidencia de que padecerán asma en el futuro, aunque pueden existir defectos menores del funcionamiento pulmonar y aumento de hiperreactividad bronquial.

2- Niños con antecedentes atópicos. En estos niños sí puede estar presente la inflamación de las vías aéreas características del asma.

### **1.7.2.- Epidemiología del asma**

El asma aparece en todas las capas sociales pero es más frecuente en las capas medias y altas. El aumento de la prevalencia del asma parece deberse a cambios en el medio ambiente interior y exterior (la climatización de las casas, el aumento de la convivencia con animales de compañía, la contaminación atmosférica y el humo del tabaco).

La evolución del asma, es muy distinta dependiendo de la edad en que comiencen los síntomas. Los sibilantes del primer año de vida, no son un indicador pronóstico de llegar a padecer asma o un asma más grave en los años siguientes, más bien el pronóstico suele ser bueno y solo persisten con síntomas entre el 15-40% de los niños. En este grupo, de inicio precoz, el pronóstico depende de los antecedentes familiares y personales de atopia, si son positivos un 80% de ellos persistirán con asma, si no son atópicos solo el 20% persistirán con asma en la adolescencia o en la edad adulta<sup>108 109 110</sup>.



Martínez & Stein describen tres posibles situaciones en los niños que tienen sibilancias en los dos primeros años de vida, son los llamados "fenotipos asmáticos" según el seguimiento de la cohorte de Tucson <sup>109</sup> :

- Sibilantes precoces transitorios: representan el 40-60% de los lactantes y el principal factor de riesgo es la disminución de la función pulmonar al nacer.

- Sibilantes persistentes no atópicos: corresponde al 20% de los lactantes y están relacionadas con infecciones virales. Dentro de este fenotipo se encuadraría la enfermedad reactiva de las vías aéreas postbronquiolitis. Se inicia antes del año de vida y se prolonga más allá de los 3-5 años. La función pulmonar, en este caso, es normal en el nacimiento deteriorándose posteriormente.

- Sibilantes persistentes atópicos: otro 20% de los lactantes, y se caracteriza por la presencia de atopia y sensibilización a alergen.

Actualmente, hay numerosas evidencias de que los niños que sufren síntomas respiratorios de vías bajas durante la infección por VRS en épocas tempranas de la vida, tienen un riesgo más elevado de presentar asma bronquial en la edad escolar. Esto fue mencionado inicialmente por McIntosh, invocando una patogenia común en la bronquiolitis y en el asma <sup>110 111</sup>.

Existen numerosas teorías que tratan de explicar este fenómeno, por qué el VRS en algunos lactantes es capaz de desencadenar sibilancias recurrentes postbronquiolitis, y se ha invocado a la coexistencia de atopia, la existencia de una vía aérea pequeña congénitamente, la teoría neurogénica, la existencia de una reacción inmunológica de hipersensibilidad tipo I en esta enfermedad, la falta de balance en las respuestas inmunológicas Th1 y Th2 y la persistencia del virus en el pulmón, entre otras.

En resumen, las infecciones víricas provocan con frecuencia episodios de sibilancias en niños pequeños no asmáticos, pero en la mayoría de ellos, las sibilancias desaparecen no desarrollando posteriormente asma. Se desconoce no sólo el papel de la infección vírica, sino también los mecanismos por los que se pueden producir sibilancias en un niño previamente sano o exacerbar aquéllas en un niño con asma <sup>112 113</sup>.

### **1.7.3.- Relación entre la bronquiolitis por VRS y el asma del lactante.**

Numerosos estudios realizados en niños hospitalizados por bronquiolitis debida al VRS, han demostrado que aproximadamente entre un 40 y un 50% de ellos, desarrollan en el primer año de vida sibilancias recurrentes, que en la mayoría de los casos desaparecen a los 3-4 años de vida. La elevada frecuencia con la que esto ocurre, sugiere que existe relación entre ambos hechos, aunque aún hoy en día, no se sabe bien cual es el mecanismo causal.

La mayoría de las hipótesis proponen que el VRS es el responsable directo de estas sibilancias persistentes o recurrentes, mientras que otros autores proponen que el virus es simplemente un marcador que identifica a niños predispuestos a padecer sibilancias persistentes en la infancia precoz<sup>109 110 111</sup>. La importancia de obtener una respuesta a esta pregunta tiene implicaciones prácticas para diseñar intervenciones profilácticas y/o terapéuticas que pudieran disminuir las sibilancias postbronquiolitis. Si es el VRS el que desencadena este fenómeno, identificar precozmente a aquellos lactantes con predisposición a padecer hiperreactividad bronquial podría justificar el empleo precoz de esteroides inhalados, anti leucotrienos o nuevos agentes antivirales o antiinflamatorios para disminuir el número de estos episodios. Si el virus es un marcador que identifica pacientes genéticamente predispuestos, su identificación precoz nos haría plantearnos medidas preventivas diferentes y un seguimiento adecuado.

Algunos autores han demostrado además, la existencia de alteraciones en la función pulmonar de estos pacientes ingresados por bronquiolitis por VRS durante el primer año de vida, muchos años después de haber sido dados de alta por este motivo. Stein y otros autores, han demostrado en una cohorte de pacientes diagnosticados de bronquiolitis por diversos virus, no necesariamente ingresados en el hospital, que el riesgo de presentar sibilancias persistentes ó recurrentes es de 3-4 veces superior a los controles sanos, hasta los 6 años de edad, y este riesgo solo disminuye al alcanzar los 13 años de edad<sup>109 114 115 116</sup>.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios que han descrito una asociación entre el VRS y las sibilancias recurrentes, son estudios observacionales y por lo

tanto, no nos permiten demostrar la causalidad de la relación, aunque la consistencia de los datos en diferentes grupos de población permiten definir esta relación.

Existen en general, según los expertos, tres teorías para intentar explicar la asociación entre la bronquiolitis por VRS y el desarrollo ulterior de sibilancias recurrentes:

- Teoría de la causalidad: el VRS, en edades tempranas de la vida, ocasiona alteraciones en el desarrollo normal del pulmón.

- Teoría del efecto; El VRS es un factor desencadenante en lactantes predispuestos con alteraciones del sistema inmune, y es capaz de condicionar el desarrollo de hiperreactividad bronquial.

- Teoría multifactorial: el desarrollo de sibilancias recurrentes en este caso, se debe tanto a factores del huésped (predisposición genética) como a factores externos ambientales <sup>117</sup>.

A pesar de las evidencias de la relación entre la bronquiolitis en períodos tempranos de la vida y las sibilancias persistentes o recurrentes, aún quedan numerosas preguntas por responder. La primera de ellas es ¿Existe una conexión directa entre la gravedad de la infección y la aparición de sibilancias recurrentes en el primer año de vida? ó ¿Existen otros factores ambientales ó genéticos que puedan contribuir al desarrollo de hiperreactividad bronquial? ó ¿Existe una conexión entre el VRS y la sensibilización alérgica posterior? Actualmente, todas estas preguntas permanecen sin respuestas adecuadas.

### **1.7.3.1.- TEORÍAS PATOGENICAS**

#### **1.7.3.1.1.- Inflamación neurogénica**

Una atractiva hipótesis patogénica que explicaría el asma postbronquiolitis por VRS, es la inflamación neurógena. En los niños con bronquiolitis, se pueden alterar las vías neuronales que influyen en el tono del músculo liso de la vía aérea y en la liberación de neurotransmisores en las vías respiratorias. Algunos autores, proponen que las alteraciones neuroinmunes desatadas por el virus, pueden iniciar y disparar la cascada inflamatoria, causando episodios recurrentes de edema de mucosa, hiperreactividad bronquial y obstrucción reversible de la vía aérea que se traducen en la clínica en episodios de sibilancias recurrentes <sup>118</sup>.

El efecto citopático del virus es el que produce los síntomas de dificultad respiratoria durante el brote agudo de bronquiolitis. Durante el primer año de vida el calibre de los bronquiolos es pequeño en comparación con la superficie alveolar, el cartílago es blando y hay un número de glándulas mucosas mayor que en otras edades. Esta situación favorece la oclusión de la vía aérea por fenómenos mecánicos. A ello se une la acción del virus que destruye células epiteliales, mucosas, y produce inflamación y descamación del epitelio mucoso, por lo que se taponan los finos bronquiolos del niño. Como resultado de la necrosis celular y de la descamación epitelial, quedan al descubierto los receptores vagales, que al ser estimulados por el frío, o la acción mecánica de la descamación, condicionan la aparición de sibilancias y disnea.

Estos hechos explican la disnea en la fase aguda, pero no la presentación de sibilancias recurrentes y disnea posterior. La inflamación de la mucosa bronquial por el VRS puede persistir hasta 6-7 semanas después de la curación del primer episodio. Las futuras reinfecciones virales producirán disnea por irritación de los receptores vagales que quedaron al descubierto con la primera infección. En la inflamación de cualquier origen, los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos activados van al foco celular y liberan radicales libres de oxígeno, proteasas y metabolitos del ácido araquidónico, todos ellos lesionan al epitelio bronquial y denudan los receptores vagales, cuyo estímulo inespecífico condiciona la aparición de broncoespasmo <sup>118</sup>.

#### **1.7.3.1.2.- Persistencia del virus en el pulmón**

Algunos estudios preliminares han demostrado que la prevención de la infección por VRS en lactantes prematuros y en modelos animales, se asoció con una disminución significativa del desarrollo posterior de hiperreactividad bronquial, por lo que parece que el virus, puede jugar un importante papel en la patogenia de la enfermedad <sup>119</sup>. Existen ciertas evidencias experimentales, en modelos animales y en experimentos *in vitro*, que sugieren que el virus podría permanecer en estado latente o en forma de bajo grado de replicación en "lugares inmunológicamente privilegiados" del pulmón evadiendo en parte al sistema inmunológico. De esta forma el VRS podría mantener una infra estimulación constante del sistema inmune, siendo responsable de la inflamación crónica y de la liberación de ciertas citoquinas presentes en los lactantes que van a desarrollar sibilancias recurrentes tras la bronquiolitis por VRS.

Es posible entonces, que haya un subgrupo de pacientes que se infectan durante la epidemia y que no consigan erradicar del todo el virus del aparato respiratorio, siendo este virus persistente, el responsable de los síntomas a medio plazo. Estos virus persistentes, además, podrían ser responsables de nuevas epidemias o brotes en la comunidad <sup>119</sup>.

#### **1.7.3.1.3.- Vitamina D y sibilancias persistentes**

Aunque la mayoría de los estudios acerca de los efectos no óseos de la vitamina D se han focalizado en los adultos, actualmente existe un interés creciente por su implicación en el desarrollo del sistema inmunológico en el feto y en el niño. La vitamina D se obtiene de los rayos ultravioletas del sol y de la dieta, de hecho, en ciertas latitudes es mas frecuente la carencia de vitamina D debido a la insuficiente exposición solar, como ocurre en algunas zonas de USA y Nueva Zelanda <sup>103 104 105</sup>.

A principios de 2007, Camargo et al, publicaron que el consumo elevado de vitamina D durante el embarazo podría disminuir el riesgo de sibilancias recurrente en los lactantes. Posteriormente, un grupo de investigadores

escoceses confirmaron la relación entre el desarrollo de sibilancias recurrentes y el consumo de vitamina D de las madres durante el embarazo, pero no la relación entre el consumo materno de vitamina D y la presencia de asma a los 5 años de edad <sup>104</sup>.

La asociación inversa entre los niveles en sangre de cordón de 25 OH vitamina D y las infecciones respiratorias, está recientemente descrita y aunque no está muy claro como un déficit de vitamina D puede explicar la aparición de sibilancias recurrentes años después, parece que los niveles de vitamina D durante el embarazo podrían alterar el desarrollo del sistema inmunológico in útero o en los primeros meses de la vida.

Otra posibilidad es que esta asociación simplemente refleje una correlación entre los niveles en sangre de cordón y los niveles séricos años después <sup>103</sup>.

#### **1.7.3.1.4.-EL VRS, la respuesta inmunológica del organismo y las sibilancias recurrentes**

Algunos autores sugieren que lo que determina la evolución de la enfermedad y el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis, es la respuesta inmune del huesped frente al virus, y que existiría una respuesta inmune diferente en aquellos lactantes que van a desarrollar sibilancias recurrentes tras el primer episodio de bronquiolitis y que esta respuesta inmune diferente se mantiene a lo largo del tiempo.

Pino y colaboradores, publican en 2009, un estudio preliminar sobre la evolución de la respuesta inmune frente a VRS, en el tracto respiratorio superior a largo plazo. Así en 20 lactantes ingresados por bronquiolitis grave por VRS, y en 12 controles sanos, se testaron 27 mediadores inmunológicos en secreciones nasofaríngeas en el momento del alta y al año. Al final del estudio el 85% de los pacientes seguidos tuvieron al menos un episodio de sibilancias, y solo el 25% en el grupo control. En los pacientes con infección por VRS se encontró una elevación mantenida de VEGF, G-CSF, IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-7 e IL-13 en aspirados nasales al año de la evolución, describiéndose por primera vez la elevación mantenida de mediadores inflamatorios incluso un año tras la bronquiolitis <sup>99</sup>.

En este momento, conviene recordar cual es la respuesta inmune normal que induce el virus respiratorio sincitial cuando llega al organismo. El VRS desencadena una respuesta inmune humoral y celular y pone en marcha los mecanismos propios de la respuesta inmune innata en un primer momento y de la respuesta inmune adquirida en un segundo tiempo.

#### **1.7.3.1.4.1.- EL VRS Y EL SISTEMA INMUNE.**

Cuando el VRS llega al tracto respiratorio del lactante se desencadena una respuesta inflamatoria e inmunológica humoral y celular a nivel local y sistémico de la siguiente manera <sup>120</sup> :

##### **Inmunidad Humoral**

Durante la infección por VRS, es posible detectar en las secreciones de los niños infectados, anticuerpos específicos IgA, IgM, IgG e IgE frente al virus. Los anticuerpos IgM aparecen de forma muy temprana y desaparecen con posterioridad; los IgG aparecen más tarde, a lo largo del tiempo, aunque no está muy bien establecido en que momento exacto. La respuesta inmunológica de las mucosas del niño frente las proteínas F y G del VRS es similar a su respuesta sérica, estando más disminuidas en los niños más pequeños y siendo menor frente la proteína G. La proteína F, parece generar una mejor respuesta que la proteína G, con mejor proporción de anticuerpos IgA e IgE. Sin embargo, un porcentaje importante de niños infectados por VRS, no producen incrementos en los niveles séricos de anticuerpos frente al virus. Esto ocurre de forma más significativa, en las edades tempranas de la vida, pero hasta el 25% de los lactantes con títulos altos de anticuerpos, pueden reinfectarse más adelante por el mismo virus.

La presencia de una actividad neutralizante en las secreciones nasales de algunos niños con infección por VRS no se ha podido correlacionar con algún nivel de protección frente a VRS o con la gravedad de la enfermedad <sup>120 121</sup>.

Esta actividad neutralizante en las secreciones, se asocia con una menor liberación del virus, y también fue observada en el momento de ingreso hospitalario en secreciones de niños con infección primaria por VRS. La acción inespecífica de esta actividad neutralizante ha sido definida y demostrada en niños en proceso de recuperación de una infección por VRS en los que se genera una respuesta inmunoglobulina A específica, que si bien no neutraliza el virus, si se correlaciona su presencia con títulos inferiores de éste.

### **Inmunidad Celular**

Se piensa que la inmunidad celular es esencial en la respuesta frente a esta infección y en la recuperación posterior. Así, los neutrófilos son el tipo celular dominante encontrado en el lavado broncoalveolar de los niños con VRS, y los niveles aumentados de IL-8 atraen a los neutrófilos <sup>122</sup>.

Se ha evaluado la producción de citoquinas inducidas por VRS en distintas células, incluyendo células epiteliales, macrófagos y mononucleares de sangre periférica <sup>122 123 124</sup>. La infección de células epiteliales respiratorias por VRS se asocia a la producción de IL-6, IL-8 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Se ha descrito también, que en el lavado nasal de niños de entre 3 meses a 4 años de edad existen niveles aumentados de IL-1a, IL-8, IL-6 y TNF-a durante las infecciones de las vías respiratorias altas por VRS. Estas citoquinas podrían iniciar o incrementar las respuestas inflamatorias locales <sup>125 126</sup>.

La susceptibilidad genética del huésped pediátrico a padecer secuelas tras una bronquiolitis (episodios sibilantes recurrentes y asma postbronquiolitis), pueden depender de la respuesta inmune del huésped frente al VRS, pero probablemente también de la relativa inmadurez del pulmón, de la edad cronológica y del momento de comienzo de la enfermedad <sup>120 127 128 129</sup>.



## **EL VRS Y LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADQUIRIDA**

### **La respuesta inmune innata**

La respuesta inmune innata tiene un papel crítico en los estadios iniciales de la infección por VRS, y condiciona la gravedad de la enfermedad. La respuesta inmune innata incluye respuestas iniciadas en las células epiteliales, en las células dendríticas y en los macrófagos y monocitos. La intensidad de la respuesta depende de el reconocimiento de moléculas asociadas al patógeno como los receptores tol-like (TLR), los receptores RIG (RLR) y los NOD like (NLR) que inducen la liberación de citoquinas y quemocinas que promueven la inflamación y el reclutamiento de células inmunes y que ponen en marcha la respuesta antiviral <sup>128 129 138</sup>. Una de las características principales de este tipo de respuesta inmune es que es inespecífica, no antígeno-dependiente y no deja memoria.

El epitelio de la vía aérea forma una barrera mecánica entre el medio ambiente y el huésped que funciona a la vez como un sistema centinela que detecta a los patógenos en la vía aérea y pone en marcha la respuesta inmune. Las células epiteliales son uno de los primeros targets del VRS.

La adhesión y la fusión viral son dos pasos críticos en el reconocimiento de la partícula viral. El VRS puede adherirse a la célula respiratoria a través de las glicoproteínas G o F de la superficie y entrar a través de la proteína F. Algunos datos recientes sugieren que las proteínas F y G de superficie pueden interactuar con los receptores de la respuesta inmune innata TLR4. Además se sabe que los pacientes con alteraciones genéticas del TLR4 presentan enfermedad mas grave <sup>130</sup>.



Figura 5.- Anticuerpos frente al VRS.

### Los receptores TLR

Hay un gran número de receptores TLR que se han relacionado con la infección por VRS como son TLR3, TLR2, TLR4 y TLR7.

- Murawski et al sugirieron que el TLR2 es un receptor de señal en la infección por VRS, que activa la respuesta inmune innata <sup>131</sup> y produce la liberación de quemoquinas, citoquinas , la migración de los neutrofilos y el control de la replicación viral <sup>130 131 132</sup>.
- El TLR3 es un receptor intracelular que reconoce RNA. Rudd y cols demostraron que la infección por VRS en ocasiones, pone en marcha la

activación de las vías TLR3, lo que promueve una respuesta inmune predominantemente Th1; mientras que en otras ocasiones el VRS produce depleción de TLR3 en cuyo caso se induce una respuesta predominantemente Th2, con liberación de IL13 y de IL5, hiperproducción de moco y acúmulo de eosinófilos en la vía aérea, sugiriendo así un mecanismo para la aparición de sibilancias recurrentes postbronquiolitis <sup>131 132</sup>.

- EL TLR4 fue el primer receptor descrito con algún efecto sobre la infección VRS a través de su interacción con la proteína F <sup>133</sup>. Posteriormente, se describió que la activación de TLR4 y CD14 por la proteína F provocaba inflamación <sup>134</sup>. Además se han descrito dos polimorfismos de TLR 4 que se asocian con la gravedad de la enfermedad <sup>132 133 134</sup>.

### **La respuesta inmune adaptativa**

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por ser antígeno-dependiente, específica y dejar memoria inmune. Comprende tanto la respuesta inmune humoral como celular.

La acción combinada de las células T CD4 y CD8, juegan un importante papel en la infección aguda por VRS, especialmente en contribuir a su finalización. Sin embargo, se sabe que la inmunidad natural que proporciona este virus es ineficaz pudiendo ocurrir numerosas reinfecciones. El inicio de la respuesta inmune adaptativa se debe a las células dendríticas, que son células presentadoras de antígenos que constituyen un "link" entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Estas células, suelen estar en las superficies de las mucosas y en otras puertas de entrada del VRS y sirven como centinelas que detectan la infección. Durante la infección aguda por VRS en el modelo experimental de ratón, se produce un aumento del número de células dendríticas en el pulmón hasta varias semanas después de la infección aguda. <sup>135 136 137</sup>. En el hombre, el impacto de la infección aguda por VRS en la activación y migración de las células dendríticas no se conoce muy bien.

La respuesta inmune celular juega un papel muy importante en la defensa frente a las infecciones virales; en el caso del VRS la inducción de una respuesta inmune celular adecuada es imprescindible para el aclaramiento del virus. Las células T CD8 son capaces de controlar la infección por VRS a través de la liberación de citoquinas y a través de la lisis de las células infectadas del huésped <sup>138</sup>.

El papel de la respuesta inmune adaptativa celular en la disminución de los títulos del virus es especialmente evidente en niños con alteraciones de la respuesta de células T donde se produce una liberación mas prolongada del virus y sufren además una enfermedad mas grave <sup>139</sup>.

La patología pulmonar que produce el VRS comparte algunas similitudes con el asma como por ejemplo la hiperproducción de moco y la presencia de hiperreactividad bronquial. El asma, como es bien sabido, se caracteriza por el desarrollo de una respuesta inmunológica predominantemente Th2, que incluye la presencia de eosinofilia pulmonar y la liberación de citoquinas Th2 como IL4, IL5 e IL13, todas ellas implicadas en la producción excesiva de moco, y en el desarrollo de hiperreactividad bronquial en modelos animales. Por ello, siempre se ha considerado que la respuesta inmune Th2 esta implicada en el desarrollo de asma y también en el desarrollo de la infección grave por VRS y el desarrollo de sibilancias recurrentes.

Existen numerosos estudios que relacionan los niveles de citoquinas Th2 y la gravedad y evolución de la enfermedad en los lactantes <sup>140 141</sup>, pero hay otros estudios en los que no se pudo demostrar esta asociación <sup>142 143</sup>. Sin embargo, a día de hoy, no hay datos concluyentes acerca de si es este predominio de la respuesta Th2 es lo que explica el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis.

Hay datos recientes que indican que la respuesta inmune Th17 pueden también influir en la gravedad de la enfermedad <sup>144 145 146</sup> pero no se sabe si influiría también, en el desarrollo de sibilancias recurrentes tras la bronquiolitis por VRS.

La IL 17 pertenece a una familia de IL que contiene 6 miembros conocidos IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. La IL- 17A y la IL-17F son muy pro-inflamatorias y juegan un importante papel en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal, pero también en el desarrollo de asma grave. Existen numerosos estudios que han examinado los niveles de citoquinas liberadas por las células T, pero aun así, actualmente hay poca información sobre la respuesta específica de las células T CD4 en la infección por VRS <sup>147</sup>.

Parece, en definitiva, que el balance entre la respuesta de citoquinas Th1 y Th2 liberadas por las células T CD4 es importante en la patogenia de la enfermedad producida por VRS.

Las células Tregs representan un tipo de células CD4 responsables de limitar el daño durante la respuesta inmune. Durante la infección aguda por VRS se objetiva un aumento del número de células Tregs en el pulmón <sup>148 149</sup>. Las citoquinas inhibitorias, como IL10, también pueden ayudar a modular la respuesta inmune adaptativa y así algunos estudios recientes, sugieren que esta IL, junto con las células Tregs son muy importantes para limitar el daño pulmonar que se produce en la bronquiolitis por VRS <sup>150 151 152</sup>. Por ello la IL 10 se considera una "citoquina reguladora".

En la figura 6 se resume el papel de cada célula y cada mediador en la respuesta inmune innata y adquirida.

Adaptive immunity   Innate immunity

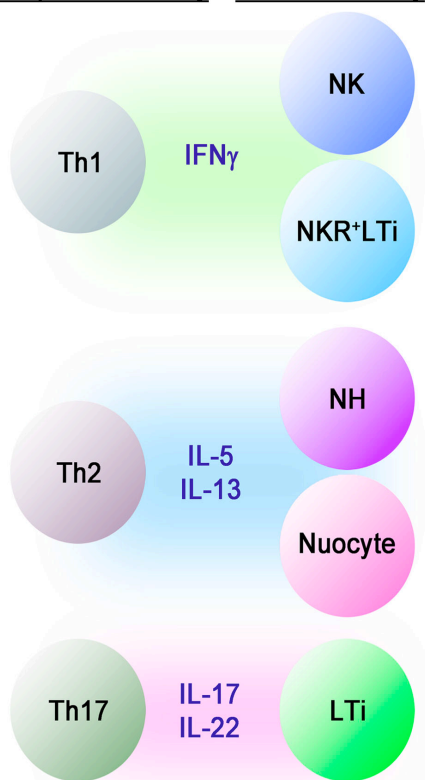


Figura 6.- Papel que juegan las diferentes células en la respuesta inmune innata. Tomada de Koyasu S.

## EL VRS Y LA RESPUESTA INMUNE TH1 TH2 Y TH17

### LAS CELULAS T HELPER

Los linfocitos T forman parte del sistema inmune, reconocen patógenos exógenos y producen mediadores inmunológicos como las citoquinas, que de forma simple pueden ser clasificadas en dos grupos: citoquinas proinflamatorias y citoquinas antiinflamatorias. Las células T Helper (CD4) son un subtipo de linfocitos T que producen grandes cantidades de citoquinas: citoquinas Th1 y Th2. Las citoquinas Th1 producidas por Células T helper son citoquinas proinflamatorias, mientras que las citoquinas Th2 son en general antiinflamatorias e inducen respuestas alérgicas <sup>153 154 155 156 157 158 159</sup>.

La diferenciación de las células "naive" Th CD4 en células efectoras Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras, es un proceso generalmente controlado por la activación de las células T receptoras (TCR). Las células T diferenciadas, Th1, Th2 y Th17 se caracterizan porque liberan un conjunto específico de citoquinas. Así, las células Th1 producen y liberan sobre todo IFN, TNF y linfotoxinas, las células Th2 liberan principalmente IL 4, 5, 9 y 13 y las células Th17 producen y liberan fundamentalmente IL17, IL 21 e IL 22.

A través de la liberación de sus citoquinas específicas, las células Th1 estimulan macrófagos, células NK y células TCD8 (Linfocitos citotóxicos) y además, estimulan la producción de anticuerpos IGG involucrados en la opsonización y fagocitosis de los patógenos; por todo ello, las células Th1 son importantes en la erradicación de patógenos intracelulares incluyendo bacterias, parásitos, hongos y virus <sup>153 154 155 156 157</sup>. Las citoquinas Th1 producen entonces inflamación y pueden perpetuar respuestas autoinmunes y también inducir alergia. Las citoquinas pertenecientes a las respuestas Th1 (IL2, IFN y TNF) están involucradas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, diabetes y enfermedades inflamatorias <sup>156 157 158 159</sup>.

Las células Th2, estimulan mastocitos y eosinófilos y sus citoquinas específicas inducen el intercambio de los linfocitos B a células productoras de IGE. Así, las células Th2, juegan un papel muy importante en la defensa del organismo frente a parásitos extracelulares y helmintos, si bien una respuesta Th2 predominante se asocia con respuestas alérgicas y enfermedades atópicas.

Las citoquinas Th2 (IL4, 5, 6, 10 y 13) tienen efectos fundamentalmente antiinflamatorios, y son capaces de inducir respuestas alérgicas y asma. Algunos autores consideran, sin embargo que la IL10 no debería formar parte de la respuesta inmune Th2 sino de un grupo propio denominado Th10.

Mosmann & Coffman en 1986, fueron los primeros autores que describieron las respuestas Th1 y Th2 y además definieron un delicado equilibrio entre ellas, con un esquema de estimulación e inhibición recíproca, pero en 1989 se describe por primera vez la IL10 que inhibe específicamente la respuesta Th1 completando así el modelo de la respuesta inmune <sup>158 159</sup>.

Recientemente, se ha descrito un nuevo linaje de células T CD4 liberadoras de IL17, 21 y 22 que se han denominado Th17. Además de su papel proinflamatorio en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, las células Th17 juegan un papel importante en la defensa del huésped frente a patógenos como *Klebsiella pneumoniae* o *Bacteroides fragilis* y en el desarrollo de asma grave<sup>146 155</sup>.

Las células Tregs se consideran moduladoras de la respuesta inmunológica y vienen a equilibrar de alguna manera este complejo escenario. Para un buen funcionamiento del sistema inmune las citoquinas de las respuestas Th1,2 y 17 mantienen un adecuado balance. Muchos investigadores sugieren que en condiciones normales existe un delicado equilibrio entre las respuestas inmunes Th1, Th2 y Th17. Sin embargo cuando el VRS entra en contacto con el organismo se liberan citoquinas tanto de la respuesta Th1 como Th2, y se sugiere que en aquellos pacientes que desarrollaran sibilancias recurrentes existiría un predominio de la respuesta Th2 y Th17<sup>157 158</sup>. En la Figura 42 se representa el complejo escenario de la respuesta inmune del organismo:

## Respuestas Th1, Th2 y Th17

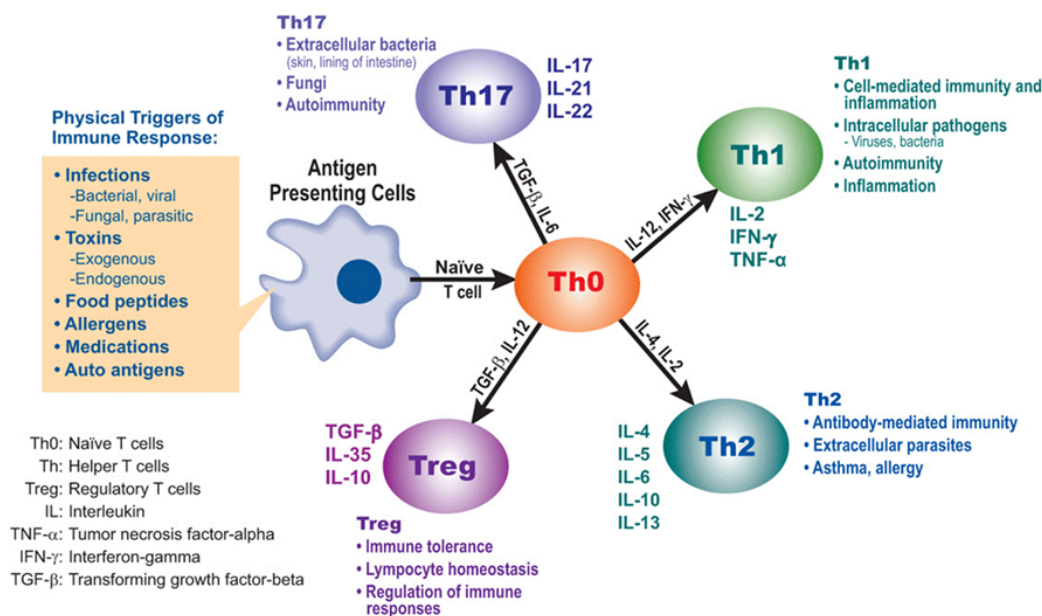


Figura 7.- Respuestas inmunológicas Th1, Th2 y Th17.



## **EL VRS Y LA RESPUESTA TH1, TH2 Y TH17**

En los lactantes con bronquiolitis por VRS, durante la fase aguda, se liberan diferentes citoquinas, quemocinas y otros mediadores de la inmunidad celular que constituyen la primera respuesta frente a la infección a nivel local <sup>160</sup>. Entre estos factores se encuentran citoquinas como IL6, TNF alfa, IFN y quemocinas como IL8, MIP 1 alfa y RANTES <sup>161</sup> y además, mediadores neuronales inflamatorios colinérgicos y no colinérgicos que producen un estrechamiento de la vía aérea a lo que se suma la excesiva producción de moco, esto explica la aparición de sibilancias, atelectasias y de hiperinsuflación pulmonar, característicos de la bronquiolitis <sup>162</sup>.

Las infecciones virales, como norma general, inducen una respuesta celular predominantemente Th1 en la que predomina la producción de IFN gamma y TNF, mientras que el asma y la atopia inducen una respuesta inflamatoria predominantemente Th2 con la consiguiente liberación de IL4 e IL5. Este perfil Th2, parece ser contra regulador y la desviación desde la respuesta Th2 a la respuesta Th1 se asocia con una enfermedad mas grave en animales de experimentación <sup>163</sup>.

Actualmente los datos publicados en lactantes con bronquiolitis son contradictorios, y se piensa que es el modo en el que se presenta el antígeno (el VRS), más que la estructura del virus lo que induce una respuesta Th1 o Th2 predominante, en estos pacientes <sup>162</sup>.

Una de las características específicas del asma es una alteración del balance entre las respuestas inmunes Th1 y Th2. En la vía aérea de las personas con asma suele haber una elevación del IFN gamma y una disminución de IL4 <sup>164</sup>, por lo que algunos autores postulan que precisamente este podría ser uno de los mecanismos por los que el VRS podría inducir el desarrollo de sibilancias recurrentes <sup>164 165</sup>.

Recientemente se ha sugerido que la respuesta inmune durante la infección VRS depende de la edad del huesped <sup>165</sup>. Ichinohe y cols demostraron que la capacidad para liberar IL4 e IFN gamma frente a la bronquiolitis por VRS aumenta con la edad <sup>165</sup>. Chung y cols en otro estudio clínico encontraron que

los niveles de IFN gamma eran menores en los lactantes de menos de 6 meses de edad <sup>166</sup>. Además, tras la infección VRS parece describirse una disminución de las citoquinas Th1 (IL2 e IFN) y un aumento de las citoquinas Th2 ( IL4 e IL13) . Sin embargo el incremento de las citoquinas Th2 también podría deberse a la maduración del sistema inmune.

La IL17 juega también un importante papel en la fisiopatología de la infección por VRS en modelos animales de experimentación. Estos estudios sugieren que la respuesta mediada por células Th17 durante la infección por VRS es independiente de la respuesta Th1 y Th2 y en algunos lactantes que luego desarrollan sibilancias recurrentes, hay una respuesta Th1 inmadura o inadecuada desde el nacimiento <sup>167 168 146</sup>.

Hasta el momento actual se ha estudiado profundamente la respuesta inmunológica del huesped frente a la infección por VRS en el momento agudo, sin embargo los complejos mecanismos inmunes por los que el VRS es capaz de favorecer el desarrollo de sibilancias recurrentes en el 50% de los niños que ingresan por una primera infección por VRS, no están bien definidos. Se acepta que una alteración en el delicado equilibrio entre las respuestas inmunes Th1,Th2 y Th17 con selección de la respuestas Th2 o Th17 es lo que explicaría que algunos lactantes desarrollen sibilancias recurrentes postbronquiolitis y otros no, de forma que aquellos lactantes que responden liberando predominantemente citoquinas de clase 2 o de clase 17 durante la fase aguda de la enfermedad son los que van a tener sibilancias recurrentes.

Sin embargo, aun hoy en día, los expertos se siguen planteando si es el VRS el que desencadena algún mecanismo inmune que favorece el desarrollo de hiperreactividad bronquial o si el virus lo que hace es seleccionar lactantes genéticamente predispuestos a padecer sibilancias recurrentes.

En esta tesis intentamos estudiar y entender los complejos mecanismos inmunológicos que tratan de explicar, el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis para describir factores tempranos de predicción que nos permitan realizar intervenciones profilácticas y/o terapéuticas.

## *Capítulo 2. Justificación del Estudio*



## **2.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

La bronquiolitis por VRS constituye una de las enfermedades mas prevalentes en la infancia, de hecho representa la primera causa de hospitalización en menores de dos años de edad.

Entre el 40 y el 50% de los niños que padecieron una bronquiolitis en el período de la lactancia desarrollan en los años posteriores sibilancias persistentes o recurrentes, y asma del lactante.

La mayoría de los autores describen y reconocen esta asociación pero aunque existen numerosas teorías patogénicas que tratan de explicar este fenómeno, aún hoy en día, no se conocen bien cuales son los mecanismos íntimos por los que se explica esta relación. En la literatura se ha recogido de forma extensa, la reacción inflamatoria y la liberación de mediadores inmunológicos que ocurre durante la fase aguda de la infección y también existen trabajos en los que se trata de correlacionar el patrón de liberación de citoquinas en la fase aguda con la evolución de la enfermedad. Sin embargo es muy escasa la literatura en la que se refleje la evolución temporal del patrón inflamatorio y la comparación de este patrón en los niños que van a desarrollar asma postbronquiolitis con el patrón de citoquinas de aquellos niños que no sufrirán sibilancias recurrentes postbronquiolitis.

Por este motivo nos planteamos inicialmente describir el patrón de liberación de mediadores inflamatorios en una cohorte de pacientes ingresados por bronquiolitis y su seguimiento durante 12 meses , recogiendo muestras en el momento basal, al mes y al año del ingreso comparando ambos patrones en relación con el desarrollo o no de asma.

En definitiva se trata de identificar factores predictivos de sibilancias recurrentes en una cohorte de pacientes seleccionados, en un hospital terciario donde existe una amplia experiencia en el manejo de esta patología, se garantiza la correcta extracción de las muestras, y su correcto almacenamiento y procesamiento en el biobanco del centro.

Conocer mejor la respuesta inmune frente al VRS, puede permitir avanzar en el conocimiento necesario para el desarrollo de vacunas frente a esta enfermedad, actualmente en desarrollo, de las que se beneficiarían tanto los lactantes con bronquiolitis en la fase aguda como también aquellos que desarrollan sibilancias recurrentes, evitándose así el desarrollo de asma postbronquiolitis e identificar nuevas dianas terapéuticas para disminuir la aparición de las sibilancias.

Por tanto estos estudios potencialmente pueden beneficiar tanto a los lactantes con bronquiolitis en la fase aguda, como también aquellos que desarrollan hiperreactividad bronquial, evitándose así el desarrollo de asma postbronquiolitis en lactantes pequeños que se infectaron por VRS durante el primer año de vida

## *Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos*





### **3.1.- HIPÓTESIS:**

Revisada en profundidad la bibliografía y el actual conocimiento sobre esta patología, nuestra hipótesis de trabajo es:

“Los pacientes infectados por VRS tienen un patrón de liberación de citoquinas que varía a lo largo de la evolución y que podría relacionarse con el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes postbronquiolitis y/o asma del lactante”. La identificación de determinados marcadores inmunológicos nos permitirán predecir el curso evolutivo de la enfermedad y quizás intervenir de manera preventiva, para evitar el desarrollo de sibilancias recurrentes tras una bronquiolitis por VRS.

### **3.2.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

#### **3.2.1.- Objetivos principales**

- 1.- Describir en nuestro medio, si los pacientes ingresados por bronquiolitis por VRS desarrollan sibilancias recurrentes a lo largo de los primeros 12 meses tras el ingreso y en que porcentaje
- 2.- Identificar y caracterizar el virus presente en las muestras clínicas de esta cohorte de pacientes y valorar si los subtipos del VRS A o B se relacionan o no con el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes postbronquiolitis y la evolución de la enfermedad.
- 3.-Estudiar si la respuesta inmunológica del huésped frente al VRS A y B es diferente.
- 4.- Definir la respuesta inmune frente al VRS en pacientes hospitalizados por bronquiolitis en tres momentos de su evolución: en el momento basal (durante el ingreso hospitalario), al mes y a los 12 meses del alta hospitalaria.

5.- Estudiar si existe relación entre la producción de citoquinas en el momento basal y en las fases de convalecencia precoz y tardía y el desarrollo o no de sibilancias recurrentes durante el período de estudio, y si es así definir mediadores inmunológicos de predicción de sibilancias recurrentes en pacientes ingresados por bronquiolitis por VRS.

### **3.2.2.- Objetivos secundarios**

1.- Describir los patrones de respuesta inflamatoria en lactantes con bronquiolitis por VRS en sangre y en secreciones respiratorias comparados con los controles sanos, y tratar de establecer diferencias en estos patrones según la edad , género y gravedad de los pacientes.

2.- Definir correlaciones entre las concentraciones plasmáticas y respiratorias de ciertas citoquinas y la gravedad de la enfermedad.

3.- Determinar si existen o no correlaciones entre los niveles de citoquinas en plasma y secreciones respiratorias en el momento del ingreso hospitalario

4.- Definir, si es posible, marcadores de predicción de sibilancias recurrentes postbronquiolitis.

## *Capítulo 4. Material y Métodos*



## **4.- DISEÑO, PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1.- Localización del estudio**

Este estudio consiste en el estudio y seguimiento de pacientes menores de 12 meses, previamente sanos, hospitalizados por bronquiolitis debida al virus respiratorio sincitial (VRS) en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) en Madrid, en las epidemias ocurridas entre 2008-2009 y 2012-2013 para ver su evolución clínica y la aparición de sibilancias recurrentes postbronquiolitis.

El HGUGM es un hospital terciario de referencia del área 1 sanitaria de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). El HGUGM cuenta con una población oscilante alrededor de 750.000 habitantes con aproximadamente 95.000 niños menores de 16 años. En el Hospital Infantil Gregorio Marañón, anualmente ingresan unos 6800 pacientes menores de 16 años. En el área de Hospitalización de Pediatría General ingresan unos 1700 pacientes cada año, y es en la unidad de Lactantes donde ingresan los pacientes menores de 2 años, aproximadamente unos 900 pacientes al año. En cada epidemia de bronquiolitis por VRS atendemos aproximadamente unas 180 bronquiolitis por este patógeno y en total casi 300 bronquiolitis anuales debidas a cualquier virus. La tasa de ingreso por bronquiolitis en nuestro Hospital se encuentra en torno al 15% aproximadamente.

El Hospital Gregorio Marañón cuenta con un Biobanco que alberga muestras de sangre, plasma, pellet celular, células, ADN, lavado broncoalveolar, suero, biopsias y tejidos, con el objetivo de fomentar la investigación en enfermedades como la Bronquiolitis, la Sepsis neonatal, la neutropenia asociada al cáncer infantil, el hipotiroidismo y las enfermedades raras<sup>169</sup>. Gracias a la especificidad de las muestras conservadas, se pueden diseñar líneas de investigación a medida, que avancen en el conocimiento de esta patología, lo que impulsará el avance de la investigación básica y clínica y redundará positivamente en el tratamiento de los afectados por esta enfermedad.

Por este motivo, las muestras de nuestros pacientes fueron recogidas en las plantas de hospitalización de Pediatría y depositadas en el biobanco de nuestro centro y la información clínica y demográfica de las muestras depositadas se encuentra codificada y custodiada por los pediatras que enroлан a los pacientes.

#### **4.2.- Definiciones**

**Bronquiolitis.-** Enfermedad inflamatoria de la vía aérea inferior causada por un virus en menores de 24 meses. En la mayoría de los casos y durante la época epidémica debida al virus respiratorio sincitial.

**Virus respiratorio sincitial.-** RNA virus del genero pneumovirus y de la familia paramixoviridae de unas 150 nanomicras de tamaño, causante de la mayoría de bronquiolitis durante los meses de Noviembre a Marzo en nuestro entorno.

**Citoquinas.-** Las citoquinas son un conjunto de proteínas de pequeño peso molecular sintetizadas por multitud de células especialmente las células del sistema inmune. Su función es inmunorreguladora, siendo fundamentales en la comunicación y en las interacciones que establecen las células del sistema inmune entre sí y con otras células. Las citoquinas dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica e intervienen en la inflamación.

**Sibilancias recurrentes.-** Presencia documentada de tres o mas episodios de sibilancias en un año de seguimiento en pacientes que han padecido previamente una bronquiolitis por VRS.

**Asma del lactante.-** Situación en la que se producen tres o más episodios de sibilancias y/o tos, en un marco clínico en el que el diagnóstico de asma sea el más probable, y se hayan excluido otros diagnósticos menos frecuentes. (Third International Pediatric Consensus.1998)

#### **4.3.- Diseño del estudio**

Se trata de un estudio experimental y prospectivo, cuyo objetivo principal fue analizar la posible relación entre la liberación de citoquinas y el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes postbronquiolitis, así como relacionar distintos perfiles de citoquinas con la gravedad y la evolución de la enfermedad. Se incluyeron lactantes menores de 12 meses, previamente sanos, sin enfermedades subyacentes, y con un primer episodio de bronquiolitis por VRS. La inclusión de pacientes se realizó en dos períodos:

-Primer periodo: Desde noviembre de 2008 a marzo de 2009.

-Segundo periodo: Desde noviembre de 2012 a marzo de 2013.

##### Diagnostico del VRS

En todos los pacientes enrolados en este estudio, se realizó el diagnóstico de bronquiolitis por VRS mediante test rápido de VRS por ELISA (Alere® BinaxNOW® RSV Test) y posteriormente se confirmó mediante cultivo viral y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

##### Protocolo de recogida de datos

Una vez confirmado el diagnóstico de la enfermedad, y en el momento del ingreso, se recogieron datos epidemiológicos y clínicos tales como la edad, el sexo, los antecedentes personales y familiares, la existencia o no de atopia, la existencia de APLV, la gravedad de la enfermedad y el score de gravedad de Wood -Downes modificado por Ferré, la necesidad de ingreso o no en UCIP, la estancia media, y los días de oxigenoterapia. Se diseñó una hoja de recogida de datos (Anexo 4) y allí se registraron las principales variables a analizar.

#### Recogida de muestras biológicas

-En el momento agudo, en las primeras 48 horas, se realizó analítica de sangre que incluía hemograma, bioquímica, y determinación de citoquinas en sangre y secreciones respiratorias.

-Al mes del alta hospitalaria (Fase de convalecencia precoz) se recoge de nuevo hemograma, bioquímica y citoquinas en plasma

-A los 12 meses del alta hospitalaria (fase de convalecencia tardía) se repite la extracción de muestras que incluyen: hemograma, bioquímica y citoquinas en plasma

#### Custodia de las muestras y consentimiento informado

Las muestras fueron depositadas en el biobanco del Hospital en el caso de las citoquinas, y el hemograma y la bioquímica se procesaron de la forma habitual en que son procesadas en nuestro Centro. Se solicita consentimiento informado a cada familia tanto para la recogida de las muestras como para su custodia en el biobanco y para la utilización de los datos clínicos y epidemiológicos de cada paciente.(Anexos 1 y 2)

### **4.4.- Pacientes**

#### **4.4.1.- Criterios de inclusión**

- Lactantes menores de 12 meses de edad, diagnosticados de bronquiolitis y hospitalizados en el HGUGM
- Primer episodio de bronquiolitis
- Test rápido de VRS positivo
- Confirmación microbiológica mediante cultivo viral y /o PCR



#### **4.4.2.- Criterios de exclusión**

- Lactantes mayores de 12 meses
- Segundo o sucesivos episodios de bronquiolitis
- Presencia de enfermedades subyacentes : prematuridad, cardiopatía, enfermedades pulmonares...
- Tratamiento con inmunosupresores incluyendo tratamiento con corticoides

#### **4.4.3.- Seguimiento de los pacientes**

A todos los pacientes se les realiza un estrecho seguimiento clínico durante 12 meses, con revisiones periódicas al mes, a los 3, 6, 9 y 12 meses del alta hospitalaria. Se recogen datos nutricionales, peso, talla, y perímetro cefálico, se recogen también datos epidemiológicos como la escolarización, la existencia de fumadores en domicilio, la existencia de atopias o alergias y se realiza una recogida escrupulosa de la existencia o no de episodios de sibilancias post bronquiolitis que hayan sido diagnosticados por un médico y que hayan precisado tratamiento.

A los pacientes perdidos durante el seguimiento, aquellos que no acuden a alguna consulta, se les realiza un contacto telefónico realizándoles encuesta clínica y epidemiológica, en algunos casos recuperamos el contacto y regresaron a consulta de seguimiento.

Aquellos en los que resultó imposible el contacto telefónico se realizó una búsqueda activa en el sistema informático del Hospital Gregorio Marañón y en el sistema informático de la CAM con el fin de poder documentar nuevos episodios de sibilancias o descartarlos.

#### **4.4.4.- Identificación de los pacientes y confidencialidad de los datos**

Los pacientes incluidos en este estudio, se identificaron con un código consecutivo según su orden de inclusión ( BQ1, BQ2...) y la temporada de inclusión ( 2008/9, 2012/13). Estos códigos figuran en la hoja de las muestras enviadas al biobanco, donde se asigna un número a cada una de las muestras recogidas (número de muestra).

También consta el código y en este caso también el número de historia clínica en la hoja de recogida de datos.

Todos los datos se custodiaron garantizando su confidencialidad, cumpliendo con la legislación nacional vigente sobre protección de datos. Asimismo fue responsabilidad del autor de este trabajo informar de modo preciso e inequívoco a los padres o tutores responsables de los pacientes, solicitando autorización expresa para que sus datos se incorporaran a una base de datos que únicamente se empleará con fines de investigación clínica.

#### **4.5.- MATERIAL Y METODOS**

##### **4.5.1.- Evaluación clínica**

La evaluación clínica de los pacientes fue realizada por tres pediatras que trabajaban en la Unidad de Lactantes, con los mismos criterios clínicos, manejando los mismos protocolos, la misma vía clínica y los mismos scores de gravedad. Se recogen datos nutricionales, peso, talla, perímetro cefálico y percentiles. Se asigna el score de gravedad a cada paciente y el tratamiento oportuno. En el seguimiento se recoge el número de episodios de sibilancias en un año así como el tratamiento recibido.

#### **4.5.2.- Medición de citoquinas**

##### En plasma:

Se extraen en un tubo con EDTA, aproximadamente 2cc de sangre que se centrifuga para obtener plasma. Se necesitan unos 100 microlitros de plasma o secreciones respiratorias para la determinación de citoquinas.

##### En secreciones respiratorias

Se extrae aproximadamente 1 cc de secreciones respiratorias mediante aspirado nasofaríngeo y se mezcla con 2cc de suero salino fisiológico; esta muestra se procesa para la obtención de pellet y se necesitan también 100 microlitros para la determinación de citoquinas en secreciones respiratorias.

##### Sistemas de medición de citoquinas:

El sistema utilizado para la determinación de las citoquinas, es el Kit Diaplex Human Th1/Th2 para inflamación que permite la cuantificación de múltiples IL: IFN, TNF, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17 e IL1B en plasma, suero, o secreciones respiratorias <sup>170</sup>.

Diaplex es una técnica muy sensible, basada en técnicas de inmunoensayo para la cuantificación simultánea de múltiples IL T Helper en una única muestra, mediante citometría de flujo <sup>171</sup>. Una de sus ventajas principales es que se disminuye de forma significativa el tiempo del análisis y la cantidad a extraer de las muestras de sangre o secreciones respiratorias si se compara con las técnicas tradicionales de ELISA. Con un volumen pequeño de muestra de unos 100 microlitros aproximadamente, este multiplex permite la medición de las IL de una forma segura, adecuada y coste-efectiva. Además esta técnica permite realizar diferentes paneles de IL en una única muestra (Figura 7):

**DIAPlex Complete** ready configured detection panels:

Panel	Th1	Th2	Th1 / Th2	Inflammation	Th1 / Th2 / Inflammation
Cat No.	880.110.004	880.120.003	880.140.007	880.130.004	880.100.010
IFN- $\gamma$	●		●		●
IL-2	●		●		●
IL-12p70	●		●		●
TNF $\alpha$	●		●	●	●
IL-4		●	●		●
IL-6		●	●		●
IL-10		●	●		●
IL-8				●	●
IL-17a				●	●
IL-1 $\beta$				●	●

Figura 8.-Diaplex. Paneles de IL para las respuestas Th1, Th2, Th17 e inflamación

Así se pueden seleccionar paneles de respuesta Th1 ( IFN, IL2, IL12, y TNF), paneles de respuesta Th2 ( IL4, IL6, e IL10) o paneles de inflamación (TNF, IL8, IL17, IL1B) o realizar todo el panel de forma simultanea que es lo que se hizo en este estudio.

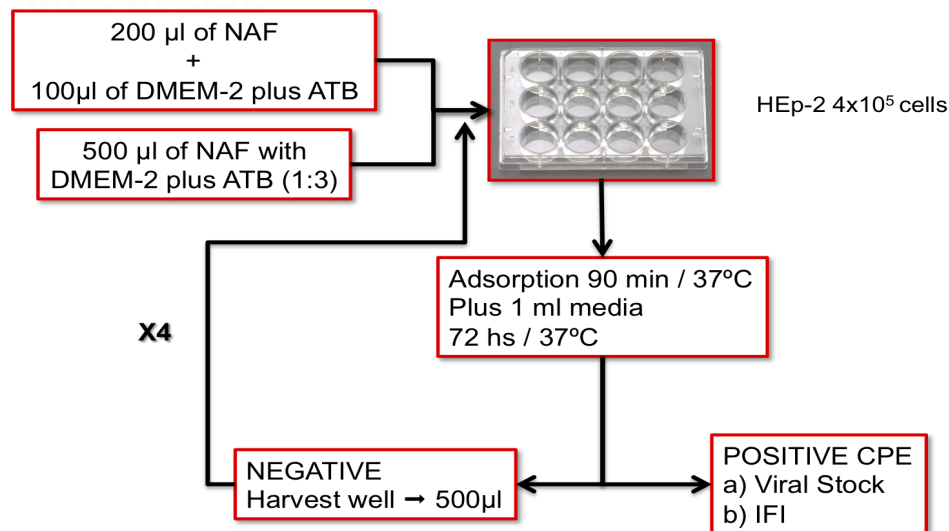
#### 4.5.3.- Envío y procesamiento de las muestras

Todas las determinaciones de las citoquinas se realizaron en el Servicio de Inmunología del HGUGM por un único inmunólogo. La sangre extraída y las secreciones respiratorias llegaron al laboratorio como máximo una hora tras su extracción.

#### 4.5.4.- Aislamiento y Tipificación del VRS

Se extraen 200 microlitros de lavado nasofaríngeo y se añaden 100 microlitros de DMEM al 2% con una mezcla de antibióticos/anti fúngicos consistente en penicilina/estreptomicina 0,1 mgr/ml, gentamicina 50 microgramos/ml y anfotericina B 1 microgramo/mililitro, se somete a un proceso de adsorción 90 minutos a 37°C y se repite a las 72 horas. Si no se obtiene VRS, se repite el proceso entero en 4 ocasiones, si se obtiene virus se somete a un proceso de Inmunofluorescencia indirecta. (Figura 8). Estos análisis se realizaron en el laboratorio de virología del ISCIII en Majadahonda (Madrid).

### RESCATE DEL VIRUS



**DMEM 2% FBS Plus ATB:** Penicillin/Streptomycin 0,1 mg/ml, Amphotericin B 1 µg/ml, Gentamicin 50 µg/ml

Figura 9.-Procedimiento de aislamiento y rescate del VRS

#### **4.5.5.- Análisis estadístico de los datos**

El estudio estadístico se realizó en la Unidad de Estadística clínica de la Fundación para la Investigación del HGUGM de Madrid, y en el Hospital Nationwide Children's en Columbus, Ohio (EEUU). El análisis estadístico de los resultados, se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 21 y el programa Prism Graphpad versión 6.

Las variables cuantitativas, se expresaron en forma de media y desviación estándar o medianas y rangos, y las variables cualitativas en forma de porcentajes. Se empleó el test de Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher para las variables cualitativas. En el caso de las variables cuantitativas se ha utilizado el test de Mann-Whitney en caso de comparaciones de dos grupos y el test de Kruskal-Wallis cuando se trataba de mas de dos grupos. Para analizar la asociación entre variables cuantitativas, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Para evaluar la capacidad predictiva del TNF, IL17, IL10, IL2 e IFN y el número de episodios de sibilancias, se calculó el área bajo la curva ROC y se evaluó la Sensibilidad y Especificidad de las pruebas

Todas las pruebas estadísticas se han considerado significativas con un valor de  $p < 0.05$

## *Capítulo 5. Resultados*





## 5.- RESULTADOS

### 5.1.- EL HUESPED. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

#### 5.1.1.- Datos generales

Se incluyeron en el estudio 37 lactantes, 17 niños (45,9%) y 20 niñas (54,1%). La edad media de la población estudiada fue de 2,4 meses (Rango: 15 días- 10 meses). La mediana de edad en esta cohorte fue de 1,5 (1-3) meses. La estancia media para éste grupo de pacientes fue de 7 (4-9) días y la mediana de días que precisaron oxigenoterapia fue de 5 (2-7) días. Se encontró una correlación positiva entre la estancia media y el score de gravedad con una  $p < 0.0001$  y una  $r = 0,7$  ( Figura 10)

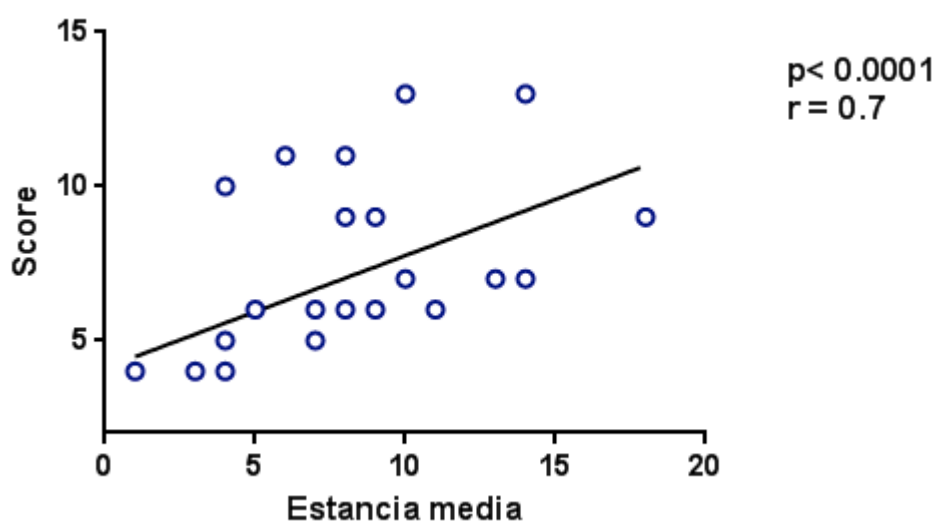


Figura 10.- Relación entre la estancia media (días) y el score de gravedad

El 70% (n=26) de los lactantes sufrieron una bronquiolitis moderada, mientras que el 30% tuvieron una bronquiolitis grave (n=11). Se obtuvieron muestras de sangre y secreciones respiratorias en el momento basal (n=37), de sangre al mes (n= 32) y de sangre al año (n= 26), debido a las pérdidas de pacientes en el año de seguimiento.

### **5.1.2.- Controles sanos**

Se reclutaron 10 controles sanos con una mediana de edad de 3 (0,7-6,5) meses. Eran pacientes ingresados en el hospital por otros motivos no infecciosos tales como realización de phmetrías o pacientes ingresados con el diagnóstico de pausas de apnea, y comparables con el grupo de pacientes en cuanto a edad y sexo. Se recogieron solamente muestras de plasma, no fue posible la obtención de secreciones respiratorias ya que eran pacientes ingresados precisamente por otras patologías no respiratorias.

### **5.1.3.- Sibilancias recurrentes**

En el seguimiento clínico de los pacientes durante 12 meses, se objetivó que el 46% de los casos (17/ 37 pacientes) tuvieron 3 o mas episodios de sibilancias recurrentes. El número de episodios de sibilancias recurrentes osciló entre 3 y 6 episodios durante un año. De este subgrupo de pacientes con sibilancias, el 30% tuvieron solamente tres episodios, mientras que el 12% presentaron 4 episodios, el 24% tuvieron 5 episodios de sibilancias y el resto , el 34% presentaron 6 ó más episodios de sibilancias recurrentes. En el grupo de pacientes que no cumplieron los requisitos para ser considerados sibilantes recurrentes, el 34% no tuvieron ningún episodio de sibilancias, en tanto que el 40% presentaron 1 episodio aislado y el 26% 2 episodios durante el seguimiento a un año. El 10% de los controles sanos (1/10), desarrollaron sibilantes recurrentes en el tiempo de estudio.( $p=0.06$ )

Las características basales de ambas cohortes se recogen en la Tabla 1:

<b>Basal</b>	<b>Sibilancias recurrentes</b>	<b>No sibilancias recurrentes</b>	<b>p</b>
Mediana edad	1(0,75-5)	1,5 (1-2)	0,74
Edad < 1,5 m	11(50%)	11 (50%)	0,9
Sexo masculino	45%	47%	0,87
Score Wood Downes Graves	41%	30%	0,50
Lactancia materna	40%	37%	0.8
Leucocitos (B)	68%	30%	0,254
Neutrofilos (B)	71%	28%	0,147
Eosinofilos (B)	61%	38%	0,181
Estancia media	8,1±4,6	6,8±2,3	0,62
Días O2	5,4±3,3	5±2,4	0,69

Tabla 1.- Características de la población estudiada

## 5.2.- CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

### 5.2.1.- Clasificación filogenética de los virus

Se realizó estudio filogenético y distribución genotípica del virus en todas aquellas muestras en las que se pudo recuperar el virus. Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2):

<b>Pacientes</b>	<b>Estación epidémica</b>	<b>Edad (meses)</b>	<b>Sueros (Basal)</b>	<b>Sueros (Convalecencia)</b>
15	2008-9	0,4-12	15	8
15	2012-13	1-12	15	14

Tabla 2.- Características de la población estudiada. Pacientes en los que se ha realizado genotipo viral

Las muestras fueron recogidas en las temporadas 2008-2009 y 2012-2013 y se enviaron al ISCIII para la identificación de las muestras, y realización de PCR y cultivo.

Se consiguió identificar el virus en 29 muestras, de ellas el VRS era del grupo A en 23 (79%) pacientes y del grupo B en 6 pacientes (21%).

## ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA

	Secuencia completa	G	Secuencia completa	F	Grupo A	Grupo B
<b>Serie 1</b>	15		15		9	6
<b>Serie 2</b>	15		14		14	0

Tabla 3.- Análisis filogenético del VRS en las temporadas estudiadas

En el siguiente árbol filogenético (Figura 11) se clasifica genotípicamente los tipos de VRS encontrados y sus diferencias respecto a cepas previamente descritas:

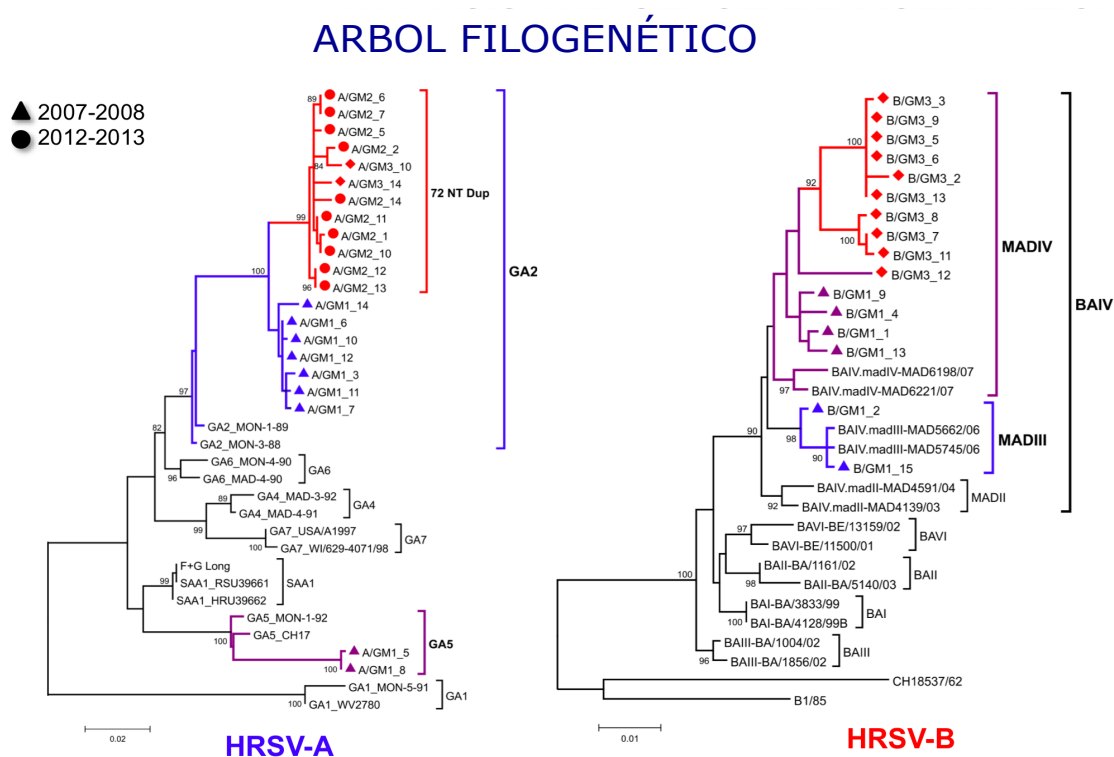


Figura 11.- Árbol filogenético y distribución por genotipos

### 5.2.2.- Relación entre el tipo de virus A/B y la gravedad y el curso evolutivo de la bronquiolitis

En 29 pacientes del total de 37 incluidos en el estudio, se consiguió caracterizar el virus y clasificarlo en dos grupos A ó B. Veintitrés (79%) de ellos fueron del grupo A y 6 del grupo B (21%). Estos pacientes fueron seguidos como todos los de la cohorte durante 12 meses y se analizó si hubo diferencias o no en la evolución de la bronquiolitis y el desarrollo de sibilancias recurrentes entre ambos grupos. En el subgrupo de pacientes infectados por VRS A, el 52,1% de ellos desarrollaron sibilancias recurrentes, mientras que un 0% de los pacientes infectados por el grupo B del VRS desarrollaron sibilancias recurrentes. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa con una  $p=0.028$  (Figura 12)

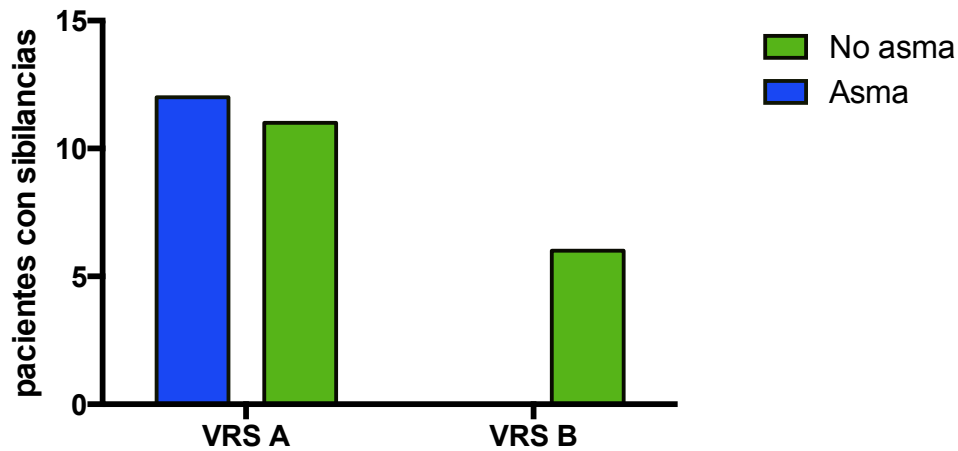


Figura 12.-Relación entre los subtipos de VRS y las sibilancias recurrentes

Se han comparado los patrones de liberación de citoquinas entre los dos grupos de pacientes, los infectados por VRS A y aquellos infectados por VRS B.

No hemos encontrado que en las concentraciones plasmáticas de las citoquinas estudiadas en el momento agudo, existan diferencias significativas. En los lactantes infectados por VRS A la mediana para IFN encontrado fue de 99,50 (64,46-126,6) picogramos/ml y en el grupo de lactantes infectados por VRS B fue de 59,40 (57,22=90,30) picogramos/ml, esta diferencia no resulta estadísticamente significativa con una  $p=0.19$  (Figura 13)

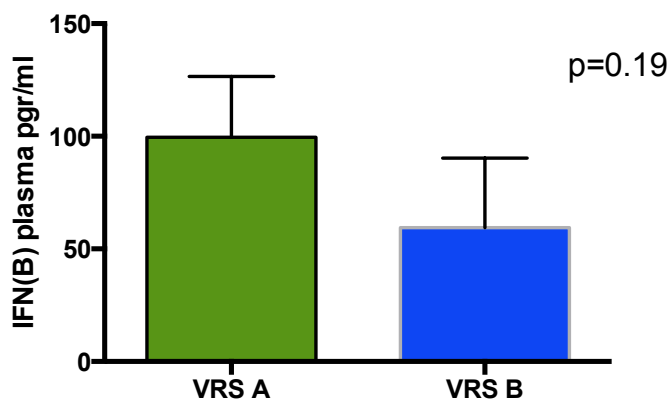


Figura 13.-Relación entre los subtipos de VRS y los niveles de IFN.

### **5.3.- INTERACCIÓN VIRUS-HUESPED. LA RESPUESTA INMUNE**

#### **5.3.1- La edad y su influencia en los niveles de citoquinas en sangre y secreciones respiratorias en la muestra basal y en las muestras de la convalecencia.**

En los 37 lactantes reclutados, la mediana de edad era de 45 días. Veintidós pacientes (56%) tenían menos de 45 días de edad. Se incluyeron 10 controles sanos con una mediana de edad de 3 meses.

Se analizaron las respuestas de citoquinas en las muestras basales, al mes y al año del ingreso en menores y mayores de 45 días. Este punto de corte se estableció en función de la mediana de edad.

Encontramos que los lactantes menores de 45 días de edad, liberan en plasma en el momento del ingreso menos IFN  $\gamma$  que los lactantes mayores de 45 días. Así, entre los lactantes más pequeños, la mediana de IFN  $\gamma$  en plasma era de 61,52 (57,22- 107,4) picogramos/ml en tanto que la mediana en el grupo de lactantes mayores de 45 días fue de 131,4 (101-324,8) picogramos/ml, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.004$ ) como se refleja en la Tabla 4 y Figura 14.

Estas diferencias se mantienen a los dos meses de edad, pero se pierden a los tres meses de vida. La correlación entre las concentraciones de IFN  $\gamma$  en plasma en el momento basal y la edad de los lactantes estudiados resulta positiva con una  $p=0.0019$  y una  $r=0,55$ . (Figura 14)

Cuando analizamos los niveles de citoquinas liberadas en plasma en el grupo de lactantes mayores y menores de tres meses no encontramos ninguna diferencia significativa.

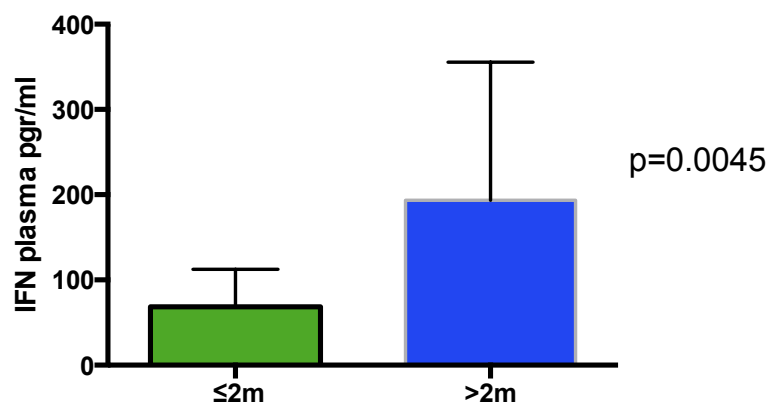
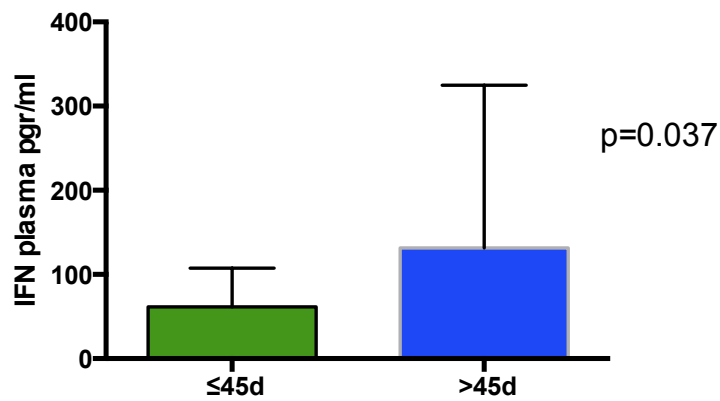


En secreciones respiratorias durante la infección aguda, los lactantes más pequeños presentaban concentraciones de TNF de 15,40 (9,8-162) picogramos/ml y los lactantes mayores de 1,5 meses tenían niveles mayores, con una mediana de 260,3 (132,3-640,7) pgr/ml, diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.005$ ), y de igual manera para la IL1B, con medianas en secreciones respiratorias mas bajas en el grupo de menor edad 3,5 (3,5-359) pgr/ml frente a 521,3 (203,8-1410) pgr/ml en los niños mayores, con una  $p=0.0131$ . (Tabla 5 y Figuras 15,16 y 17). Si establecemos el punto de corte para la edad en los 3 meses, entonces observamos como se pierde la significación estadística en el caso de la IL1B ( $p=0.086$ ), pero aún se mantienen las diferencias en el caso del TNF encontrando que en los menores de 3 meses la mediana de TNF fue de 38.01(9,8-250,9) picogramos/ml y en el grupo de lactantes mayores de 3 meses la mediana de TNF encontrados fue de 387,0 (135,9-1393) pgr/ml, diferencia estadísticamente significativa con una  $p=0.0447$ . Respecto a la IL10 en secreciones respiratorias las diferencias son significativas en todos los puntos de corte: 45 días, 2 y 3 meses. (Figura 16). En el caso de la IL6 en secreciones respiratorias las diferencias encontradas no alcanzaron la significación estadística pero se obtuvo una  $p=0,053$ .

Comparando con los controles sanos, los niveles plasmáticos de IFN en los lactantes con bronquiolitis por VRS eran significativamente mayores que en los controles sanos ( $p=0.016$ ) pero con una tendencia a niveles mas bajos en los menores de 45 días

Basal plasma (pgr/ml)	Menores 45 d	Mayores 45 d	p
<b>IFN</b>	61,5 (57,2-107,4)	131,4(101-324,8)	<b>0,004</b>
<b>TNF</b>	22,6 (22,6-22,6)	22,66 (14,9-22,6)	0,8
<b>iL17</b>	8,70 ( 3,1-12,7)	9,43 (8,7-210,4)	0,18

Tabla 4.- Concentraciones de citoquinas en plasma (basal) según edad



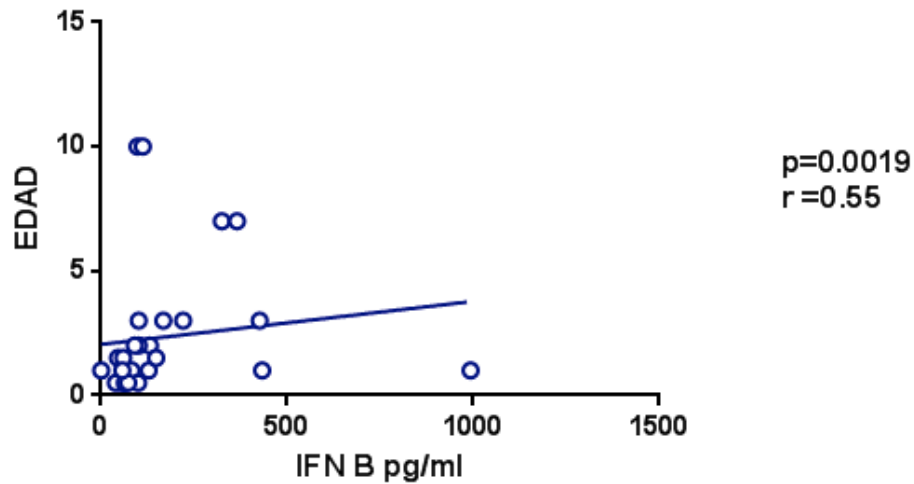


Figura 14.-Relación entre los niveles de IFN en plasma(basal) y la edad

Basal. Secreciones (pgr/ml)	Menores 45 días	Mayores 45 días	p
<b>IFN</b>	117,2 (0,8-473,8)	335 (88,9-620,1)	0,23
<b>TNF</b>	15,4 (9,8-162,2)	260 (132,3-640)	<b>0,005</b>
<b>IL17</b>	8,7 (8,7-8,7)	8,7 (8,7-8,7)	0,90
<b>IL1B</b>	3,5 (3,5-359)	521,3 (203-1410)	<b>0,013</b>
<b>IL 10</b>	1,7 (1,7-1,7)	1,7 (1,7-29)	<b>0,04</b>

Tabla 5.- Concentraciones de citoquinas respiratorias (basal) según edad

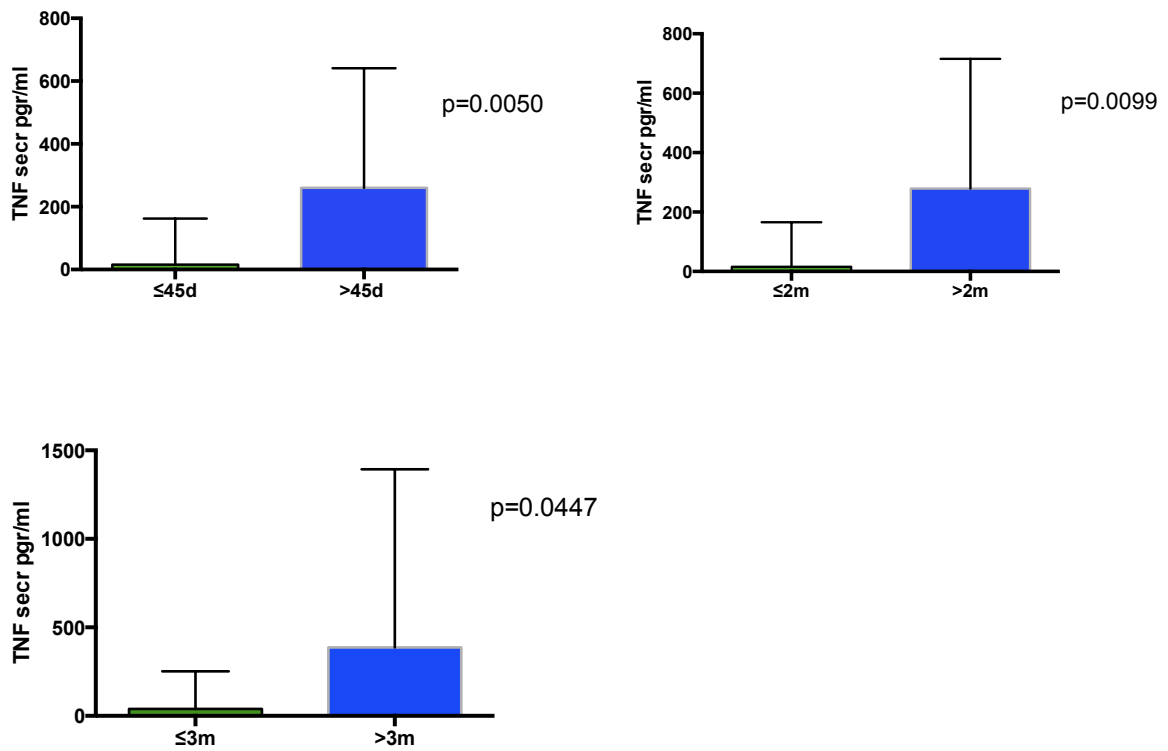


Figura 15.-Relación entre los niveles de TNF en secreciones respiratorias en el momento basal y la edad

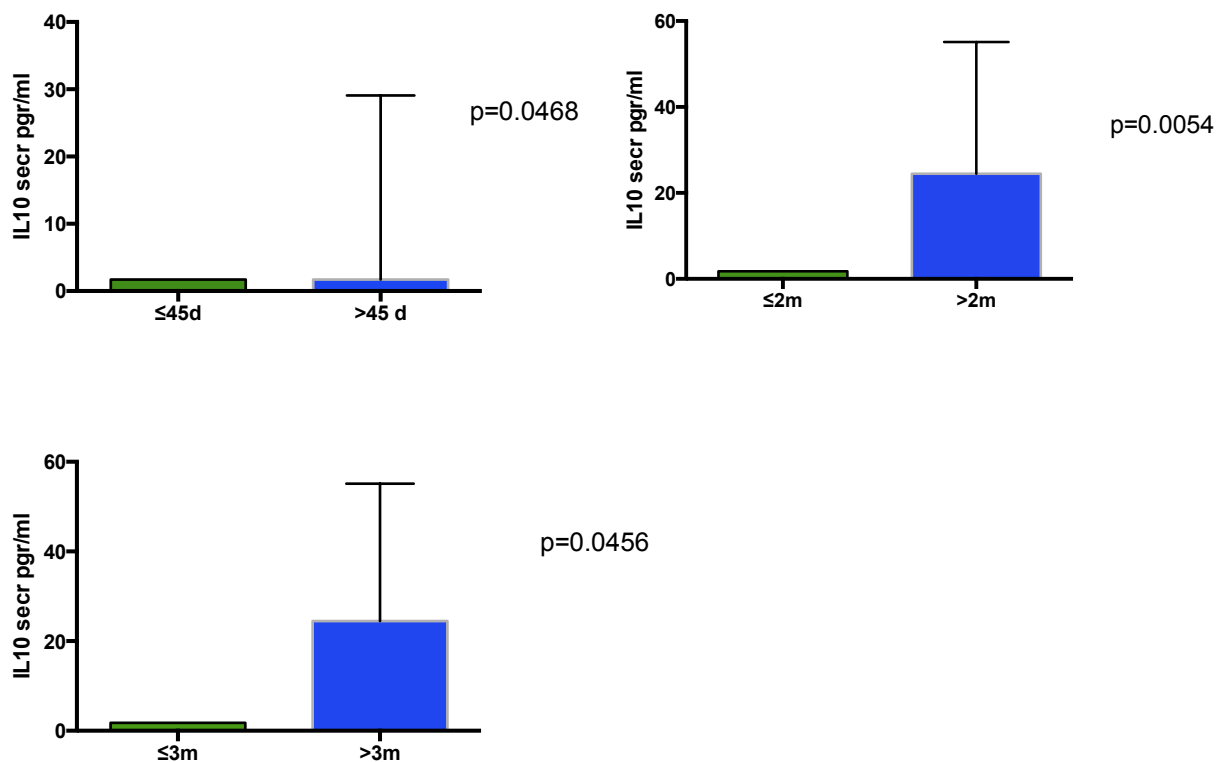


Figura 16.-Relación entre los niveles de IL10 en secreciones respiratorias y la edad

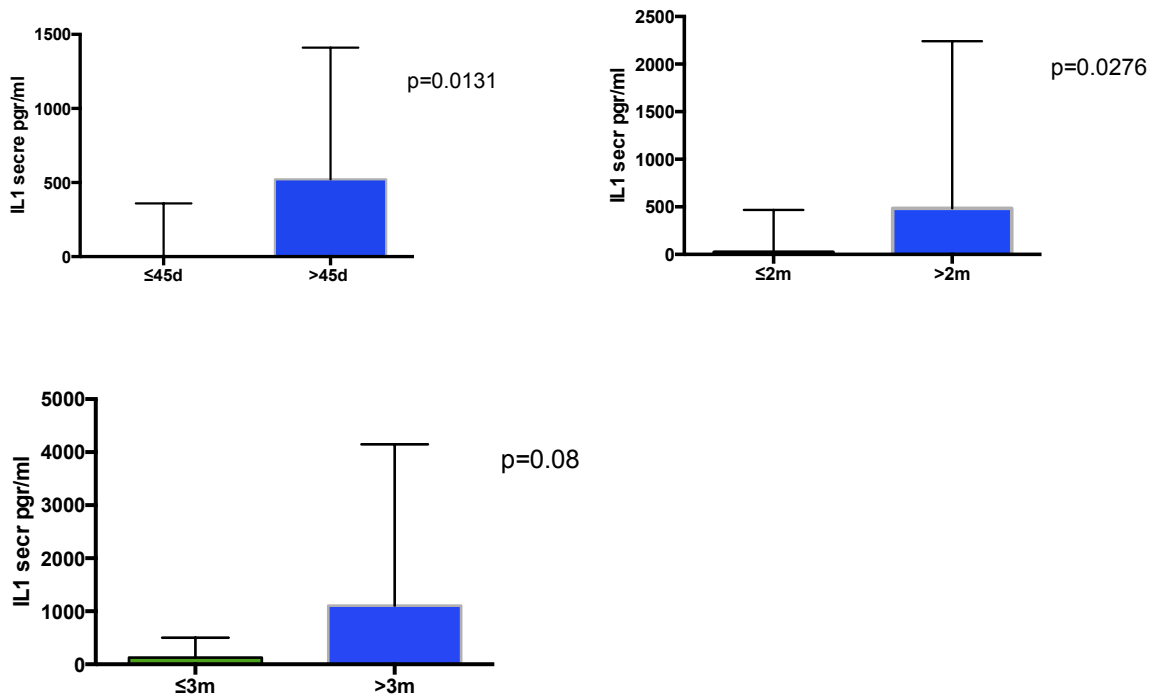


Figura 17.-Relación entre la IL1B en secreciones respiratorias y la edad

### 5.3.2- El género y su influencia en los niveles de citoquinas en sangre y secreciones respiratorias en la muestra basal y en las muestras de la convalecencia.

Se han analizado las concentraciones plasmáticas y en secreciones respiratorias de citoquinas en el momento agudo de la infección y se han comparado en lo que respecta al género. Hemos encontrado que los varones liberan mayor cantidad de IFN gamma en el momento basal en secreciones que las mujeres, 438,2 (86,8-887,3) pgr/ml para los varones comparado con 117,2 (0,8-288,5) pgr/ml para las mujeres y esta diferencia tiene una  $p=0,051$  que roza la significación estadística). Figura 18

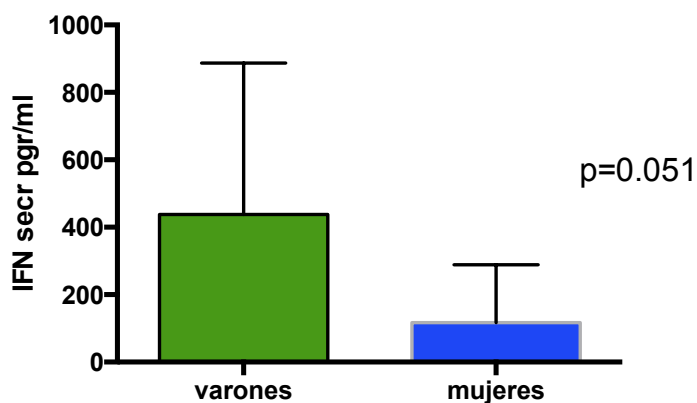


Figura 18.- Concentraciones de IFN basal varones/mujeres

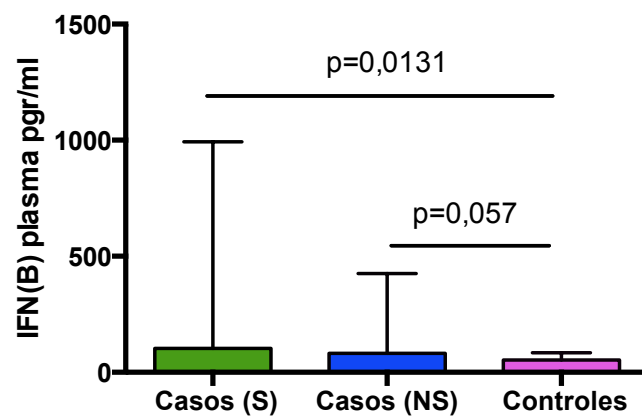
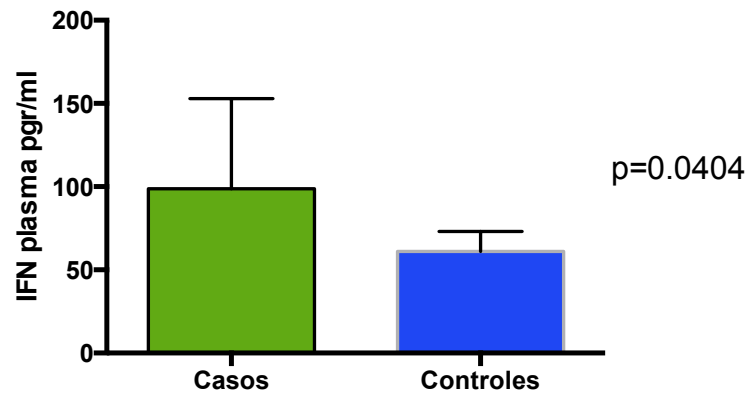
### 5.3.3.- Diferencias en el patrón de citoquinas entre los casos y los controles sanos en muestras basales y en convalecencia.

En la cohorte estudiada se establecen tres grupos de lactantes:

- Diecisiete pacientes que tuvieron 3 o mas episodios de sibilancias
- Veinte pacientes que no presentaron sibilancias recurrentes y
- Diez controles sanos

Durante la fase aguda de la bronquiolitis, se comparó el patrón de liberación de citoquinas entre los 37 pacientes incluidos en el estudio y los 10 controles sanos. Encontramos que el patrón es diferente presentando los casos concentraciones más elevados de citoquinas plasmáticas en lo que se refiere a IFN 98,77 (59,40-152,9) pgr/ml frente a 61,07 (43,86-73,10) pgr/ml en los controles, y respecto a IL 17 8,760 (4,43-22,05) pgr/ml vs 5,70 (5,05-22,03) pgr/ml. La diferencia es significativa en lo referente a IFN ( $p=0.0404$ ) y no significativa para IL17 ( $p=0.59$ ) ni IL10 ( $p=0,17$ ) (Tabla 6 y Figuras 19 y 20).

En el momento basal se analizó también si había diferencias en las concentraciones de IL en plasma entre los controles sanos y los dos subgrupos de casos enfermos ( aquellos que van a desarrollar sibilancias recurrentes y aquellos que no), encontrando diferencias significativas en lo referente a IFN gamma ( Figura 19).



Kruskal-Wallis test

Figura 19.- Diferencia en las concentraciones de IFN plasmático entre casos y controles y diferenciando casos con y sin sibilancias recurrentes.

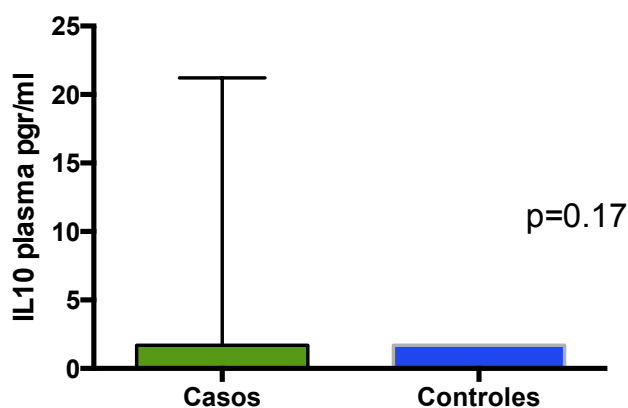


Figura 20.- Diferencias en las concentraciones de IL10 en plasma entre casos y controles

Comparando el patrón de citoquinas plasmáticas en la muestra obtenida en los casos enfermos al mes de la evolución, con los controles sanos (grupos comparables por edad), encontramos unos niveles de IFN en los controles sanos de 61 (43,8-73,1) pgr/ml y en los casos enfermos de 194,8 (59-411,7) pgr/ml diferencia significativa con  $p=0,04$ . Respecto al TNF al mes encontramos diferencias significativas entre los controles sanos y los casos con una  $p=0,016$ . La IL17 presenta unas concentraciones de 5,7 (5-22) pgr/ml en los controles sanos y de 8,7 (8,7-8,7) pgr/ml en los casos enfermos, diferencia que es estadísticamente significativa con una  $p=0.033$ . Para la IL 6 los niveles en controles sanos son 21,4 (21,4-21,4) pgr/ml comparado con los casos enfermos 35,4 (1,4-65,4) pgr/ml y la  $p=0.000$ . (Tabla 7)

En las muestras extraídas al año no se ha realizado este análisis porque el grupo control y el grupo de casos tras 12 meses de seguimiento no son comparables.



<b>Plasma Basal (pgr/ml)</b>	<b>Controles n=10</b>	<b>Casos n=37</b>	<b>p</b>
<b>IFN</b>	61 (43,86-73,10)	98,7 (59,4-152,9)	<b>0,04</b>
<b>TNF</b>	22,60 (22,6-22,6)	22,6 (20,7-22,6)	0,54
<b>IL17</b>	5,7 (5-22)	8,7 (4,4-22)	0,59
<b>IL6</b>	21,4 (21,4-21,4)	21,4 (1,4-21,4)	0,51
<b>IL1B</b>	3,5 (3,5-3,5)	3,5 (3,5-3,5)	0,87
<b>IL10</b>	1,7 (1,7-1,7)	1,7 (1,7-1,7)	0,17

Tabla 6.- Concentraciones de citoquinas en plasma (basal) casos y controles

<b>Plasma 1 m (pgr/ml)</b>	<b>Controles n=10</b>	<b>Casos n=32</b>	<b>p</b>
<b>IFN</b>	61 (43,8-73,1)	194,8 (59-411,7)	<b>0,044</b>
<b>TNF</b>	22,6 (22,6-22,6)	9,8 (9,8-17,7)	<b>0,016</b>
<b>IL17</b>	5,7 (5-22)	8,7 (8,7-8,7)	<b>0,033</b>
<b>IL6</b>	21,40 (21,4-21,4)	35,4 (1,4-65,4)	<b>0,000</b>
<b>IL1B</b>	3,5 (3,5-3,5)	41,5 (1,3-103)	0,70
<b>IL10</b>	1,7 ( 1,7-1,7)	1,7 (1,7-19,3)	0,16

Tabla 7.- Concentraciones de citoquinas en plasma (1mes). Casos y controles

### 5.3.4- GRAVEDAD

#### 5.3.4.1.- Relación gravedad/ sibilancias persistentes

Si comparamos la relación existente entre el score de gravedad en el momento del ingreso hospitalario y el desarrollo de sibilancia persistentes, no encontramos diferencias significativas. Así el 70% de los casos presentaban una bronquiolitis grave y de ellos el 58,8% tuvieron sibilancias persistentes.

El 30% de los lactantes presentaron una bronquiolitis moderada y de ellos el 41,2% presentaron sibilancias persistentes en el primer año de seguimiento. Esta diferencia no resultó significativa con una  $p=0,478$ . (Tabla 8)

Gravedad	No Sibilancias	Sibilancias	p
Moderada	14	10	
Grave	6	7	
Totales	20	17	0.478

Tabla 8.- Relación gravedad/sibilancias recurrentes

### 5.3.5.- EDAD, GENERO Y SIBILANCIAS

#### 5.3.5.1.- Relación edad/ sibilancias persistentes

Al comparar si la edad condiciona o no el desarrollo de sibilancias postbronquiolitis, encontramos que 22 pacientes eran menores de 45 días de edad y 15 mayores de 45 días. En el grupo de lactantes menores de 45 días de edad, 11 (50%) desarrollaron sibilancias recurrentes y 11 (50%) no

desarrollaron sibilantes postbronquiolitis. En el otro grupo, los mayores de 45 días (15 pacientes), el 60% (9 pacientes) no desarrollaron sibilantes y el 40% (6 pacientes) tuvieron 3 o mas episodios de sibilancias persistentes. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas  $p=0,549$ . (Tabla 9)

Edad	No Sibilancias	Sibilancias	p
<45 días	11	11	
>45 días	9	6	
Totales	20	17	0,549

Tabla 9.- Relación edad/sibilancias recurrentes

#### **5.3.5.2.- Relación género/sibilancias persistentes.**

No se han encontrado diferencias en la evolución de la enfermedad según el género. No hay diferencias significativas en el porcentaje de varones que desarrollan sibilancias recurrentes y el porcentaje de mujeres que lo hacen.

#### **5.3.6.- CORRELACIONES ENTRE EL PERFIL DE IL Y LA GRAVEDAD**

##### **5.3.6.1.- Correlaciones entre las principales IL en plasma en el momento basal y en convalecencia y los parámetros de gravedad**

Se establecieron correlaciones entre las citoquinas en plasma y algunos parámetros de gravedad, como la puntuación del score de gravedad, la estancia media y el número de días de oxígeno. Se utilizó la prueba no paramétrica de correlación de Spearman.

En el momento basal encontramos correlación entre las concentraciones de IL 8 (B) en plasma y la estancia media ( $p=0,023$  y  $r=0,41$ ). (Figura 22). Además se encontró que aquellos pacientes con bronquiolitis graves (score mayor o igual a 8) tenían concentraciones mas elevadas de TNF en plasma basal y al revés cuando la bronquiolitis era mas leve (score menor de 8) las concentraciones de TNF eran menores ( $p=0,0169$ ). (Figura 21)

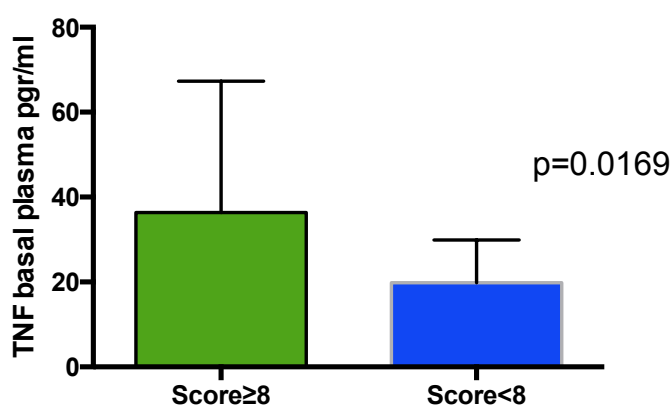


Figura 21.- Diferencias en el score de gravedad y las concentraciones de TNF en plasma basal

En las muestras extraídas al mes del alta de la bronquiolitis, encontramos correlaciones significativas positivas entre la puntuación del score de gravedad y los niveles de IFN, de forma que cuanto mas elevados son los niveles de IFN, mayor es la puntuación del score de gravedad con una  $r=0,323$  y una  $p=0,013$ . (Figura 22). Respecto a la IL10 en las muestras de convalecencia correspondientes al mes de evolución, se encontró una correlación positiva y casi significativa entre los niveles plasmáticos de IL10 y los días de oxígeno durante el ingreso hospitalario, de manera que cuanto mayores son los niveles de IL10 mas días de oxígeno han precisado esos pacientes, con una  $r=0,338$  y una  $p=0,058$ . Igualmente se detectó una correlación positiva entre los niveles de IL10 plasmática al mes de evolución y la estancia media; así aquellos lactantes que tuvieron una estancia mayor en número de días en el hospital, son precisamente aquellos lactantes con niveles plasmáticos mas elevados de IL10 con una  $r=0,354$  y una  $p=0,047$ . No se encontraron correlaciones con el resto de citoquinas estudiadas.

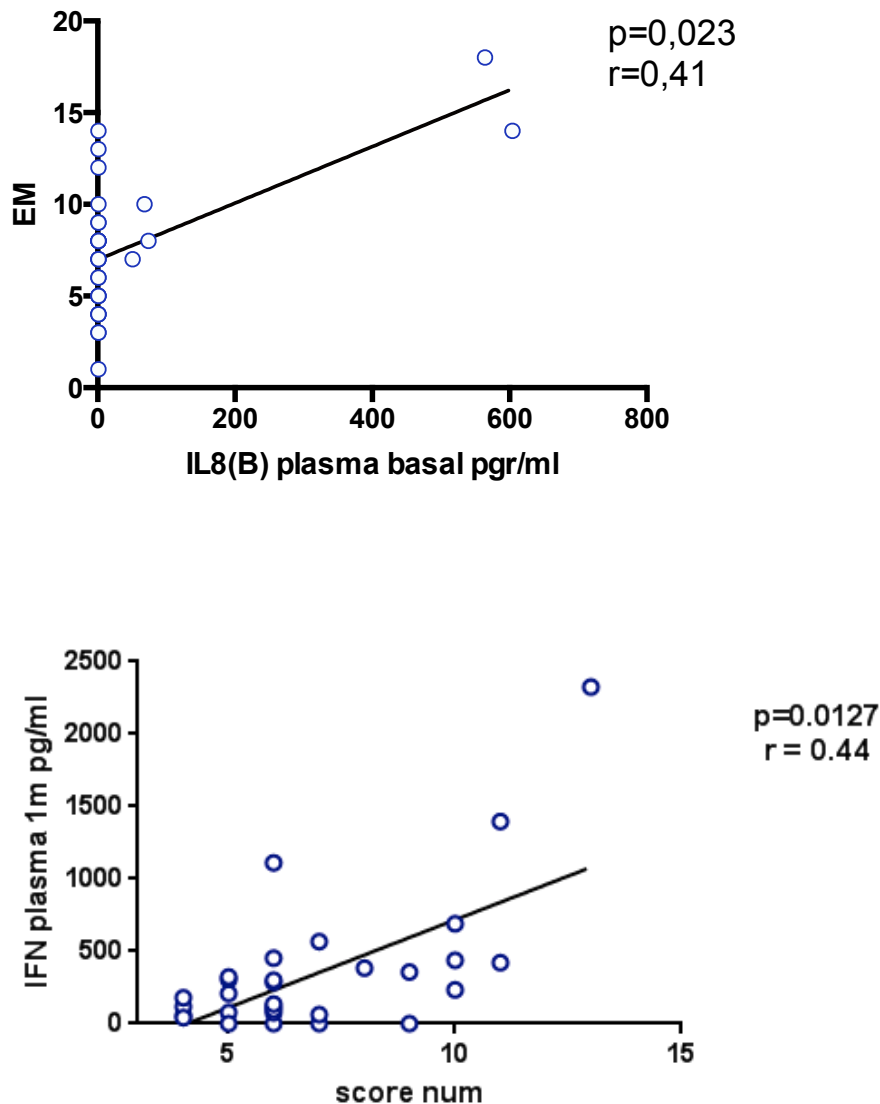


Figura 22.- Correlaciones positiva entre IL 8 plasma basal y la estancia media y el IFN plasmático al mes y la puntuación del score de gravedad

En las muestras de sangre extraídas en la fase de convalecencia al año de evolución, encontramos correlaciones entre los niveles plasmáticos de TNF, IL10, IL6 e IL 17 y el numero de episodios de sibilantes recurrentes, con significación estadística en todos los casos. Así, para el TNF, encontramos una correlación positiva con una  $p=0,013$  y  $r=0,482$ . En el caso de IL 10, la correlación que encontramos con el numero de episodios de sibilancias fue de

$r=0,64$  y la  $p=0,000$ . Para la IL 17, los valores que se encontraron en su correlación con el número de episodios de sibilantes recurrentes fue  $r=0,430$  y  $p=0,028$ . (Figuras 23 y 24)

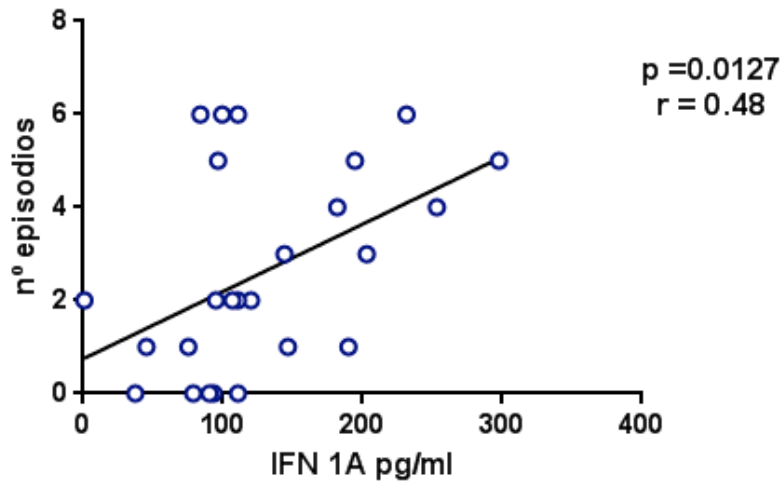


Figura 23.- Correlación positiva entre los niveles de IFN al año en plasma y el número de episodios de sibilancias recurrentes

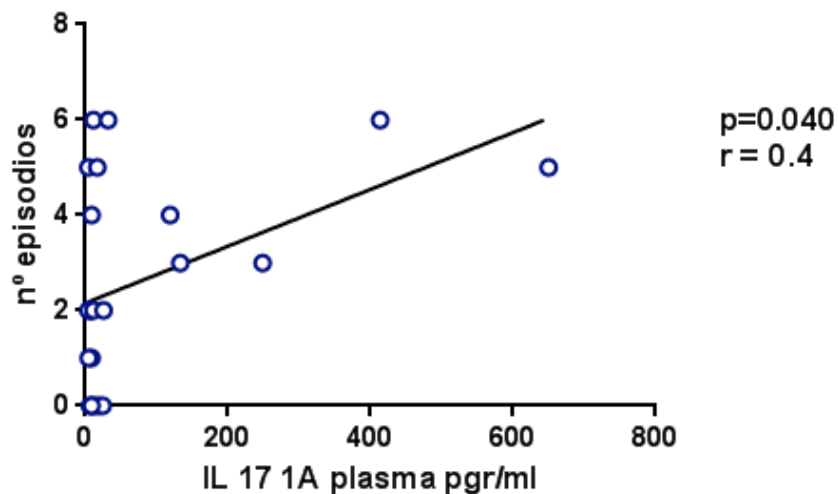
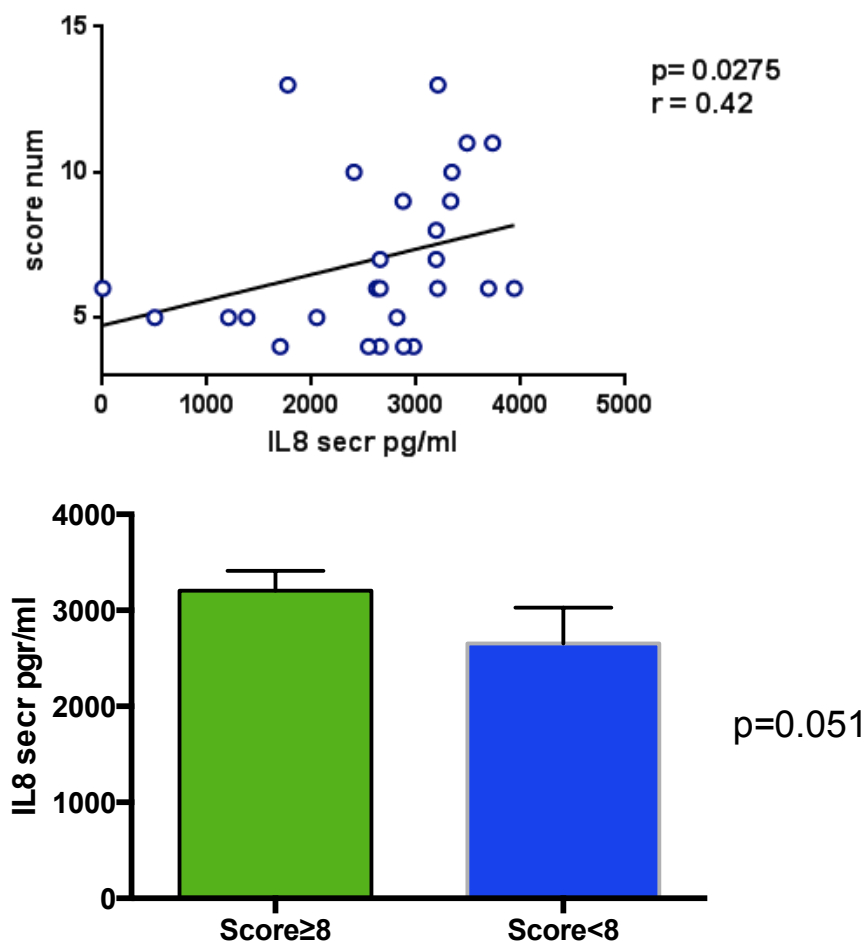


Figura 24.- Correlación positiva entre la IL17 al año en plasma y el número de episodios de sibilancias

### 5.3.6.2.- Correlaciones entre las principales IL en secreciones respiratorias en el momento basal y los parámetros de gravedad.

Cuando se analizaron estos datos en relación con los niveles de citoquinas en secreciones respiratorias en el momento basal, se encontró una correlación positiva entre los niveles de IL8 y la puntuación del score de gravedad, de forma que los niveles de IL8 en moco durante la fase aguda de una bronquiolitis por VRS pueden predecir la gravedad de la enfermedad con una  $r=0,424$  y una  $p=0,027$ . También se describe una correlación positiva entre IL8 en secreciones respiratorias y los días de oxígeno, aunque no alcanza la significación estadística.( Figura 25)



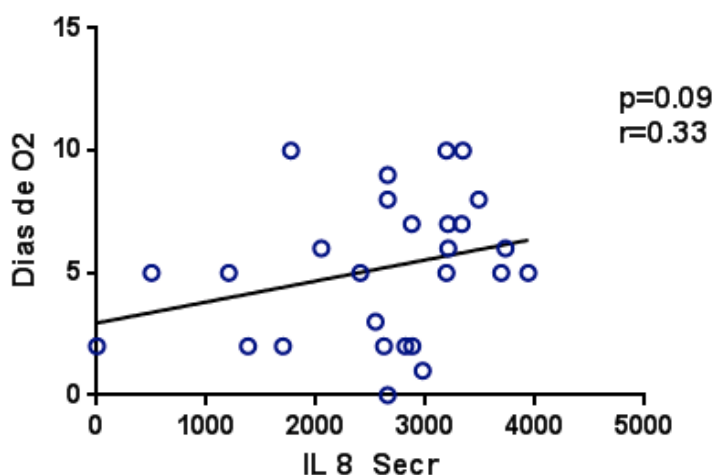


Figura 25.- Relación entre la IL8 en secreciones y la gravedad de la bronquiolitis

### 5.3.7.- RELACIÓN ENTRE EL HEMOGRAMA , LOS NIVELES DE IL Y EL DESARROLLO DE SIBILANCIAS POSTBRONQUIOLITIS

#### 5.3.7.1.- Relación leucocitos, linfocitos, neutrofilos y eosinófilos y los niveles en plasma de algunas interleuquinas

Se buscó una relación entre los niveles de leucocitos del hemograma en las determinaciones basal, al mes y al año de seguimiento, con los niveles de las IL mas significativas en cada momento de la evolución, sin encontrarse significación, aunque en el caso de los niveles de IFN en la muestra basal encontramos que la mediana de las concentraciones de IFN en lactantes con leucocitos en rangos normales fueron de 82,14 (59,40-127,7) pgr/ml y la concentración encontrada para aquellos lactantes con leucocitos elevados (>15,000 leucocitos) fueron de 166,67 (98,02-432,8) pgr/ml y esta diferencia obtiene una  $p=0,051$  sugiriendo que la presencia de leucocitosis podría relacionarse con los niveles elevados de IFN en plasma en el momento agudo y el mismo hallazgo se encontró con las concentraciones plasmáticas de IFN en la muestra del año de la evolución y la leucocitosis del hemograma a los 12 meses si bien la p obtenida fue de 0,080.



Respecto a la eosinofilia encontramos que solamente la muestra del hemograma del año de evolución se relaciona con los niveles de IFN al año de seguimiento, aunque la  $p=0.069$

#### **5.3.7.2.- Relación entre el hemograma y el desarrollo de sibilancias persistentes postbronquiolitis y las concentraciones de citoquinas.**

Se intentó buscar una relación entre las diferentes células sanguíneas del hemograma y el desarrollo de sibilancias postbronquiolitis. En los momentos basal y al mes de la convalecencia, no se encontró relación alguna. Sin embargo al año de la evolución se constató que en los lactantes que desarrollaron sibilancias durante el año de seguimiento tuvieron un número más elevado de eosinófilos comparado con aquellos lactantes que no desarrollaron sibilancias. Se consideró eosinofilia cuando los pacientes presentaron más de 500 eosinófilos/ $\mu$ l en sangre periférica. (Tabla 10)

<b>Eosinófilos</b>	<b>No Sibilancias</b>	<b>Sibilancias</b>	<b>p</b>
<b>Eos. elevados Basal</b>	38,5%	61,5%	0,291
<b>Eos. elevados 1m</b>	41,2%	58,8%	0,462
<b>Eos. elevados 1a</b>	30,8%	69,2%	<b>0,047</b>

Tabla 10.- Relación eosinofilia/ sibilancias recurrentes

No se encontraron correlaciones con los leucocitos, los linfocitos o los neutrófilos en ningún momento de la evolución. Cuando analizamos la relación entre las células sanguíneas y las concentraciones de citoquinas en plasma en el momento basal encontramos que existen diferencias, de forma que aquellos lactantes en los que las concentraciones de IFN gamma en plasma son

mayores tienen más neutrofilia y aquellos en los que las concentraciones de IL8 en plasma en el momento basal son mayores también tienen neutrofilia con  $p=0.051$  y  $p=0.012$  respectivamente (Figura 26)

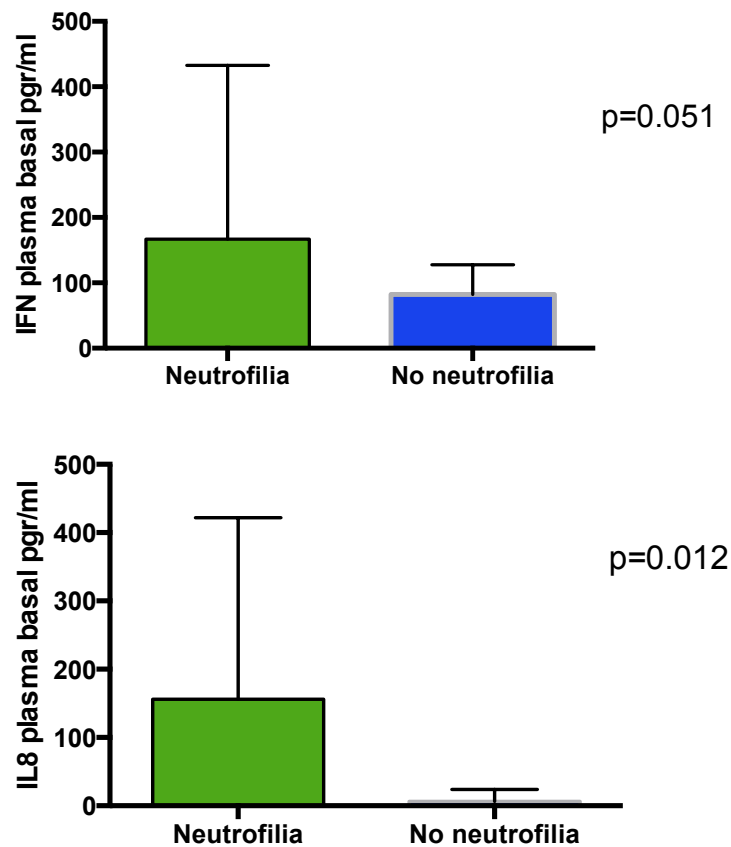


Figura 26.- Relación entre las concentraciones de IFN e IL 8 en plasma y los neutrófilos

### 5.3.8.- RELACIÓN ENTRE LOS PERFILES DE CITOQUINAS EN PLASMA EN EL MOMENTO BASAL, AL MES Y AL AÑO DE EVOLUCIÓN Y EL DESARROLLO DE SIBILANCIAS PERSISTENTES

#### 5.3.8.1.- Relación entre las citoquinas plasmáticas y las sibilancias postbronquiolitis

##### 5.3.8.1.1.- Relación IL en plasma basal y sibilancias recurrentes

Se midieron en plasma IFN, TNF, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17, e IL1B en el momento agudo de la infección. Se investigó la posible relación entre los niveles plasmáticos de IL en el momento basal y el desarrollo ulterior de sibilancias postbronquiolitis. En el momento agudo de la infección la liberación de citoquinas no difiere de forma significativa entre los subgrupos de lactantes que desarrollaron sibilancias y los que no. (Tabla 11)

<b>Basal (pgr/ml)</b>	<b>Sibilancias</b>	<b>No sibilancias</b>	<b>p</b>
<b>IFN</b>	103,5 (62-246,4)	81,8 (59,4-123,8)	0,275
<b>TNF</b>	22,6 (11,1-30,29)	22,6 (20,2-22,6)	0,720
<b>IL2</b>	12,40 (12,4-45,9)	12,40 (12,4-12,4)	0,513
<b>IL4</b>	4,3 (4,3-4,3)	4,3 (4,3-4,3)	0,86
<b>IL6</b>	21,4 (1,4-21,4)	21,4 (21,4-21,4)	0,58
<b>IL8</b>	1,3 (1,3-13,6)	1,3 (1,3-1,3)	0,45
<b>IL10</b>	1,7 (1,7-1,7)	1,7 ( 1,7-15,2)	0,34
<b>IL12</b>	3,4 (3,4-3,4)	3,4 (3,4-3,4)	0,46
<b>IL17</b>	15,3 (4,43-334,2)	8,7 (3,5-10,87)	0,107
<b>IL1B</b>	3,5 (3,5-3,5)	3,5 (3,5-12,94)	0,347

Tabla 11.- Relación IL plasma (basal) / sibilancias recurrentes

#### **5.3.8.1.2.- Relación IL en plasma al mes de evolución y sibilancias recurrentes.**

Se obtuvieron muestras de 32 pacientes. Se encontraron varias relaciones entre las concentraciones de citoquinas en las muestras del mes de evolución y el desarrollo de sibilancias recurrentes. Las concentraciones de IL2 al mes de evolución en el grupo de pacientes no sibilantes obtuvieron una mediana de 12,40 (12,4-12,4) pgr/ml y en el grupo de lactantes que desarrollaron sibilancias de 19,36 (12,40-55,1) pgr/ml diferencia significativa con un valor de  $p=0,044$ .

Respecto al TNF, la mediana obtenida en los niños sin sibilancias fue de 9,8 (9,8-9,8) pgr/ml y en el subgrupo de pacientes sibilantes fue 18,50 (9,8-62,40) pgr/ml; esta diferencia es significativa para una  $p=0.0001$ .

La IL10 al mes de evolución estaba significativamente más elevada en los lactantes con sibilancias recurrentes respecto al grupo que no desarrollo sibilancias 13,40 (1,7-41,79) pgr/ml y 1,70 (1,70-1,70) pgr/ml  $p=0,020$

Igualmente ocurre con los valores de IL17 entre los dos grupos de lactantes, encontrándose diferencias en las medianas e intercuartiles 8,7 (8,7-1024) pgr/ml y 8,7 (8,7-8,7) pgr/ml, con un valor de  $p=0,0019$

Los niveles de IL8 también son diferentes en los dos grupos, si bien no se alcanzó la significación estadística ( $p=0,053$ ), e igualmente ocurre con las medianas de IFN al mes obteniéndose una  $p=0.069$  (Tabla 12 y Figuras 27 ,28 y 29)

<b>Plasma 1m</b> <b>(pgr/ml)</b>	<b>Sibilancias</b>	<b>No sibilancias</b>	<b>p</b>
<b>IFN</b>	305(78,6-690,3)	117,2 (50,4-279,2)	0,069
<b>TNF</b>	18,5 (9,8-62,4)	9,8 (9,8-9,8)	<b>0,0001</b>
<b>IL2</b>	19,36 (12,4-55,11)	12,4(12,4-12,4)	<b>0,044</b>
<b>IL8</b>	1,3 (1,3-194)	1,3 (1,3-1,3)	0,053
<b>IL10</b>	13,40 (1,7-41,79)	1,7 (1,7-1,7)	<b>0,020</b>
<b>IL17</b>	8,7 (8,7-1024)	8,7 (8,7-8,7)	<b>0,0019</b>

Tabla 12.- Relación IL plasma (1m) / sibilancias recurrentes

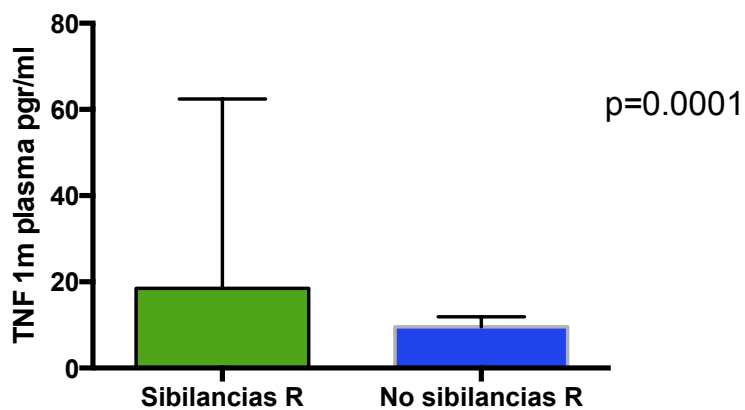


Figura 27.- Asociación entre las concentraciones de TNF al mes de evolución y el desarrollo de sibilancias recurrentes

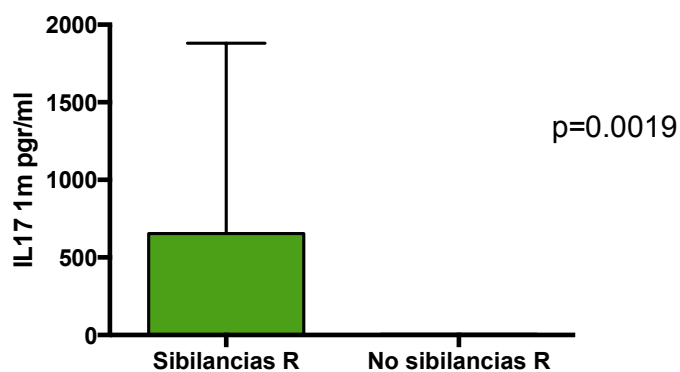


Figura 28.- Asociación entre las concentraciones de IL17 al mes de evolución y el desarrollo de sibilancias recurrentes

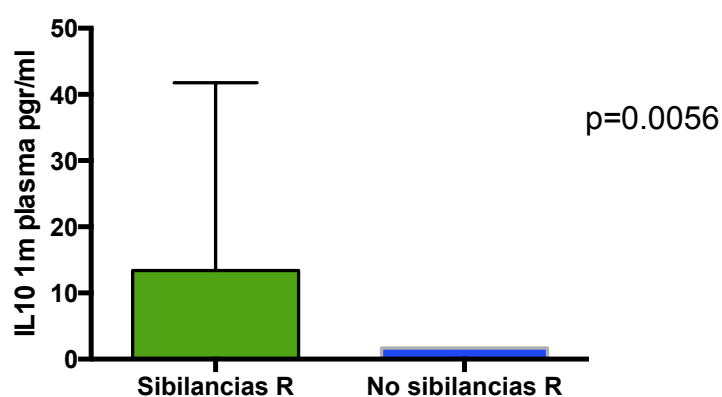


Figura 29.- Asociación entre las concentraciones de IL10 al mes de evolución y las sibilancias persistentes

#### 5.3.8.1.3.- Relación entre las IL en plasma al año de evolución y sibilancias recurrentes.

Se extrajeron muestras de sangre al año de seguimiento a 26 pacientes. Se realizó el Kit de IL plasmáticas, con el fin de determinar la existencia o no de relaciones entre algunas IL en plasma en esta fase de la enfermedad y el desarrollo de sibilancias persistentes postbronquiolitis.

Así, en lo referente a IFN , se encontró que en los lactantes sin sibilantes las medianas en plasma eran de 93,46 (75,12-110,9) pgr/ml, en tanto que en el subgrupo de lactantes con sibilancias recurrentes la mediana plasmática fue de 182 (99,51-231,5) pgr/ml. Esta diferencia resulta significativa con una  $p=0.0042$ .

La IL 10 en las muestras extraídas al año, reveló que en los lactantes que no tuvieron ningún episodio de dificultad respiratoria en el año de seguimiento las concentraciones de esta IL fueron de 1,7 (1,7-1,7) pgr/ml comparado con 16,81 (1,7-35,41) pgr/ml en el grupo que presentó numerosos episodios de sibilancias, esta diferencia obtuvo un valor de  $p=0.001$ . De igual manera ocurrió para la IL 17, puesto que se encontraron unos niveles medianos de 8,7 (7,28-12,43) pgr/ml en aquellos lactantes sin sibilancias frente a 31,84 (11,54-248,7) pgr/ml si los lactantes tenían episodios recurrentes de dificultad respiratoria ( $p=0,0054$ ) (Tabla 13 y Figuras 30 ,31 y 32).

<b>Plasma 1a</b>	<b>Sibilancias</b>	<b>No sibilancias</b>	<b>p</b>
<b>(pgr/ml)</b>			
IFN	182 (99,5-231,5)	93,46 (75,12-110,9)	<b>0,004</b>
TNF	22,6 (9,8-23,4)	22,6 (22,6-22,6)	0,919
IL2	12,4 (12,4-72,41)	12,4 (12,4-12,4)	0,051
IL10	16,8 (1,7-35,41)	1,7 (1,7-1,7)	<b>0,001</b>
IL17	31,84 (11,5-248,7)	8,7 (7,2-12,43)	<b>0,0054</b>

Tabla 13.- Relación IL plasma (1a) / sibilancias recurrentes

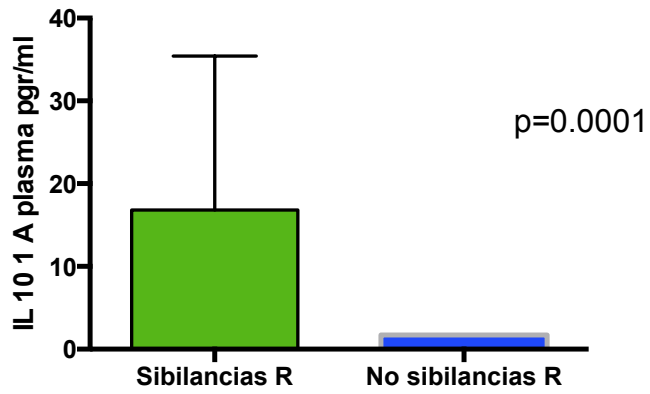


Figura 30.- Relación entre los valores de IL10 al año de evolución en plasma y las sibilancias recurrentes

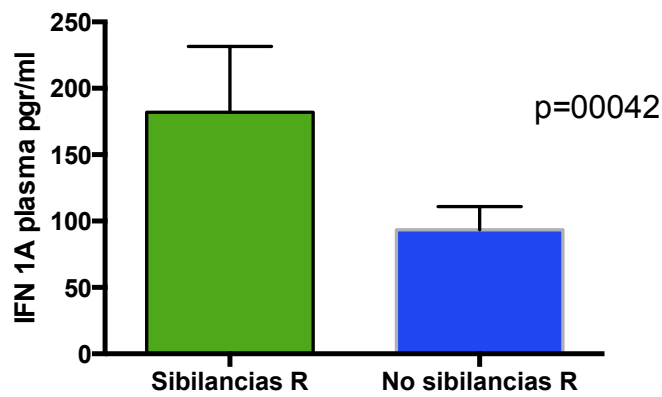


Figura 31.- Relación entre las concentraciones de IFN al año en plasma y las sibilancias recurrentes

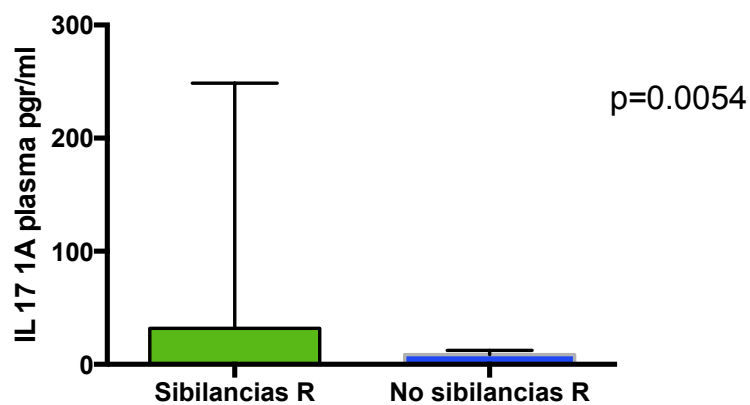


Figura 32.- Asociación entre la IL17 al año en plasma y las sibilancias recurrentes



Se estudió de forma temporal, la evolución de las concentraciones plasmáticas de todas las citoquinas en el momento basal, al mes y al año de evolución tratando de encontrar diferencias en su concentración. En el caso de IFN gamma y TNF encontramos diferencias estadísticamente significativas como se recoge en las Figura 33.

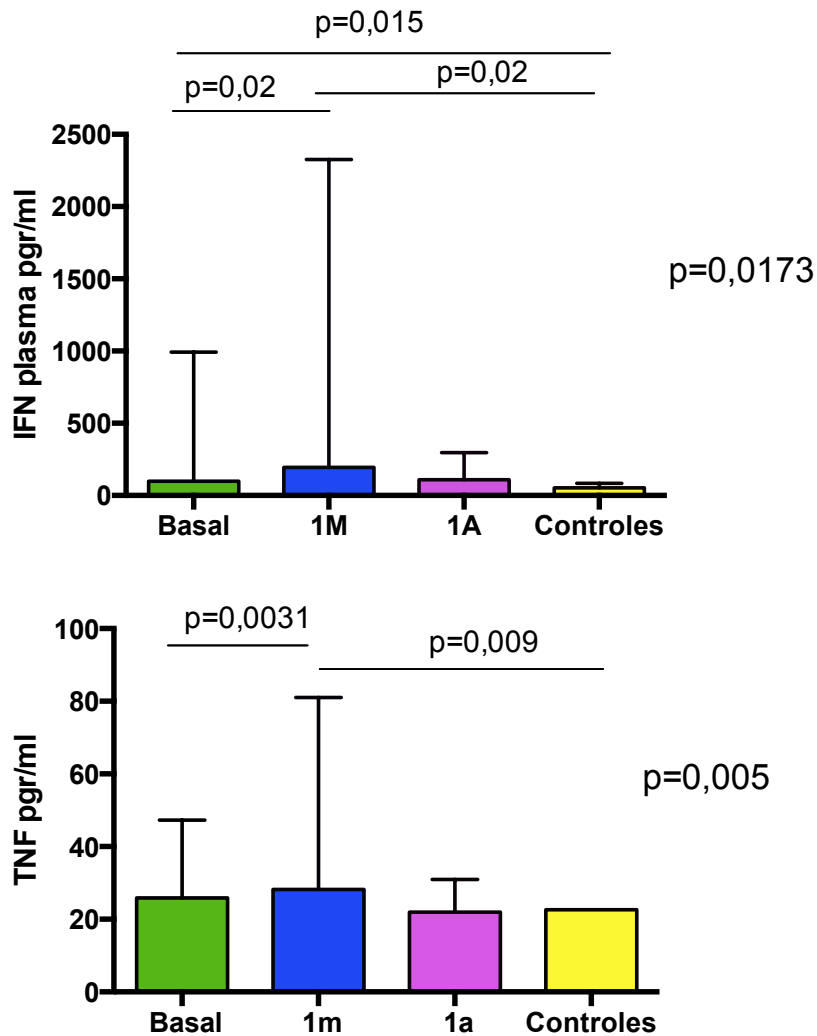


Figura 33.- Cambios en las concentraciones de IFN, y TNF en plasma en el momento basal, al mes y al año de evolución. ( Kruskall-Wallis)

#### **5.3.8.2.- Relación entre las IL en secreciones respiratorias y sibilancias recurrentes.**

Se analizaron las concentraciones de citoquinas en secreciones respiratorias en el momento agudo de la enfermedad. Se ha estudiado si existen diferencias en las concentraciones de alguna de estas citoquinas entre el grupo de pacientes que desarrollaran sibilancias recurrentes y aquellos otros que no. No existen diferencias significativas en ningún caso.

#### **5.3.8.3.- Relación entre las IL en plasma y secreciones respiratorias y el número de episodios de sibilancias recurrentes**

Se buscaron correlaciones entre los perfiles de citoquinas en plasma y secreciones respiratorias y la evolución posterior de la bronquiolitis, en lo que respecta no solo al desarrollo o no de sibilancias recurrentes, sino también al número de episodios de sibilancias documentados en el año de seguimiento.

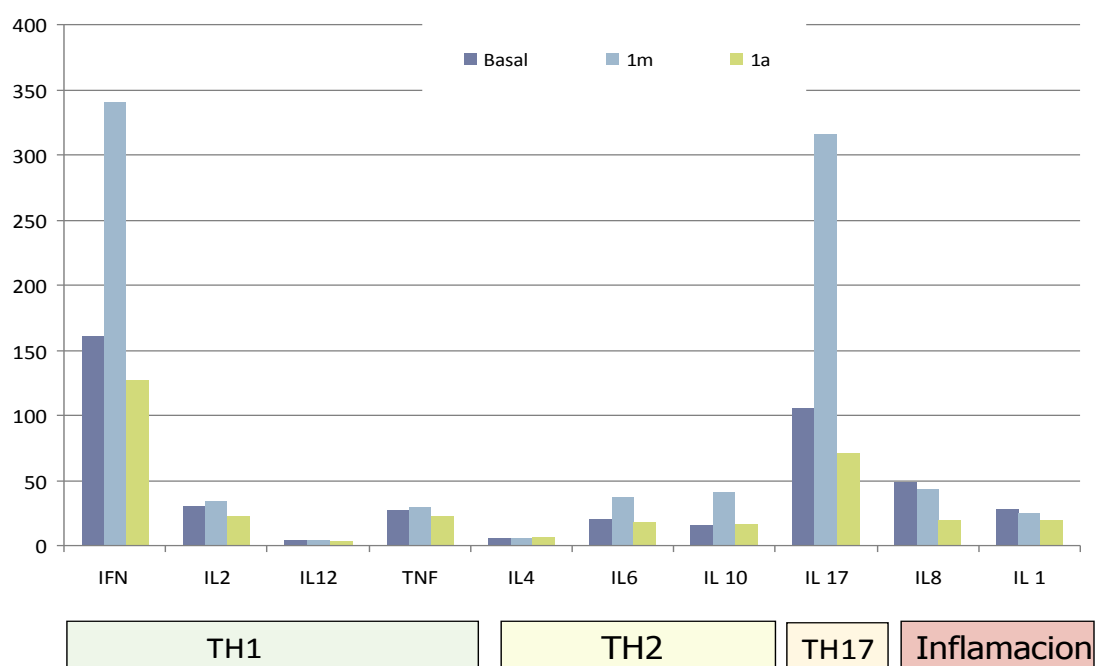
En la muestra plasmática basal no encontramos correlaciones entre el perfil de citoquinas y el número de episodios de sibilancias. Sin embargo al analizar las muestras de plasma al mes de seguimiento encontramos las siguientes correlaciones positivas:

- Cuanto mayores son las concentraciones de TNF en plasma al mes de evolución, mayor es el número de episodios de sibilancias recurrentes en un año de seguimiento con una  $r=0,468$  y  $p= 0,007$ .
- Concentraciones mas altas de IL17 en la muestra de plasma al mes de seguimiento, se correlacionan con un mayor número de episodios de sibilancias con una  $r=0,413$  y  $p=0,019$ .

Cuando se analizaron las muestras de plasma recogidas en la fase de convalecencia al año de evolución, se encontró que aquellos pacientes con niveles mas elevados de IFN eran los pacientes que desarrollaron mayor número de sibilancias, con una  $r=0,482$  y una  $p=0,013$ . De la misma manera, los lactantes que tienen concentraciones mas elevadas de IL10 e IL17 al año de seguimiento, son los que tienen mayor número de episodios de sibilancias postbronquiolitis con una  $r=0,641$  y  $p=0,000$  para IL10 y una  $r=0,430$  y  $p=0,028$  para IL17 (Figuras 23 y 24).

#### 5.3.8.4.- La respuesta inmune Th1, Th2, Th10 y Th17 y el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis

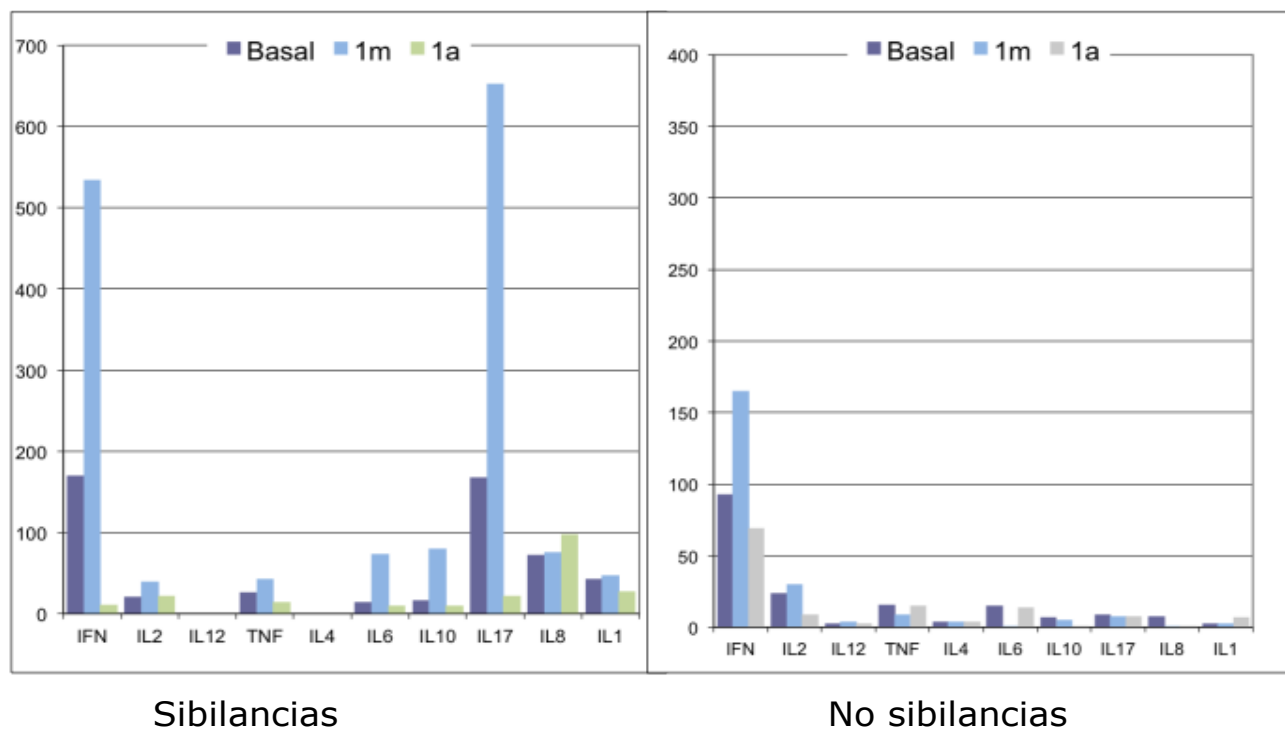
Si agrupamos las citoquinas en respuestas Th1,Th2,Th17 y citoquinas inflamatorias el perfil encontrado es el siguiente:



R. Rodriguez y cols 2014

Figura 34.- Patrones de respuesta Th1,Th2 y Th17 en la bronquiolitis por VRS en el momento basal y en la convalecencia.

En los lactantes que desarrollan sibilancias recurrentes postbronquiolitis encontramos un patrón mas marcado de respuesta Th1 y Th 17 tal y como se recoge en la Figura 35:



R. Rodríguez y cols 2014

Figura 35.- Diferencias en los patrones de liberación de citoquinas en lactantes con y sin sibilancias recurrentes tras una bronquiolitis por VRS.

### 5.3.9.- Correlación entre las IL plasma y las IL en secreciones respiratorias

Se analizó el panel entero de citoquinas en plasma en el momento basal, y se correlacionó con las concentraciones de esas mismas citoquinas en el lavado nasal recogido durante el ingreso hospitalario, en el momento agudo. La correlación de las concentraciones de citoquinas en sangre y en secreciones respiratorias se resume en la Tabla 14.

Encontramos una correlación negativa entre las concentraciones de IL6 en plasma y en secreciones respiratorias, con una  $r = -0,4$  y una  $p = 0,028$ , así como una correlación positiva entre la IL6 en secreciones respiratorias y la IL2 en plasma con una  $r = 0,6$  y una  $p = 0,001$ . En lo relativo a la IL10 encontramos numerosas correlaciones, la mas importante de todas ellas, es la que se establece entre las concentraciones de IL10 en plasma y en secreciones respiratorias, se trata de una correlación positiva con una  $r = 0,52$  y una  $p = 0,007$ . Asimismo, existen otras correlaciones positivas entre IL10 en secreciones nasales y las IL2,4,8 e IFN en plasma , todas ellas con  $r$  superiores a 0,5 y  $p$  inferiores a 0,05. Se describe también una correlación negativa entre IL10 en secreciones respiratorias e IL6 en plasma basal con una  $r$  negativa de -0,6 y una  $p = 0.000$ . (Figuras 36 y 37).

La IL 2 en secreciones respiratorias tiene una correlación positiva con la IL 6 en plasma ( $r = 0,4$  y  $p = 0,004$ ) y El IFN gamma en secreciones, se correlaciona positivamente con la IL6 en plasma con  $r = 0,45$  y una  $p = 0,023$ .

No se han encontrado correlaciones entre el TNF, la IL4, IL17, IL8 y IL 1B en secreciones respiratorias y ninguna citoquina en plasma.

<b>Correlaciones r y p</b>	<b>IFN secreciones</b>	<b>IL2 secreciones</b>	<b>IL6 secreciones</b>	<b>IL10 secreciones</b>
<b>IFN plasma</b>	r=0,177 p=0,396	r=0,071 P=0,73	r=0,23 P=0,27	<b>r=0,494</b> <b>P=0,001</b>
<b>IL2 plasma</b>	r=-0,126 p=0.547	r=-0,10 P=0,63	<b>r=0,61</b> <b>P=0,001</b>	<b>r=0,69</b> <b>P=0,000</b>
<b>IL4 plasma</b>	r=-0,146 P=0,485	r=0.6 P=0,77	r=-0,32 P=0,11	<b>r=0,55</b> <b>P=0,004</b>
<b>IL6 plasma</b>	<b>r=0,45</b> <b>p=0,023</b>	<b>r=0,40</b> <b>p=0,04</b>	<b>r=-0,43</b> <b>P=0,028</b>	<b>r=-0,65</b> <b>P=0,000</b>
<b>IL8 plasma</b>	r=0,1 P=0,66	r=-0,12 P=0,055	r=0,21 P=0,29	<b>r=0,5</b> <b>P=0,011</b>
<b>IL10 plasma</b>	r=0,03 P=0,8	r=0,14 P=0,47	r=0,21 P=0,30	<b>r=0,52</b> <b>P=0,007</b>

Tabla 14.- Correlaciones entre IL plasma y secreciones respiratorias

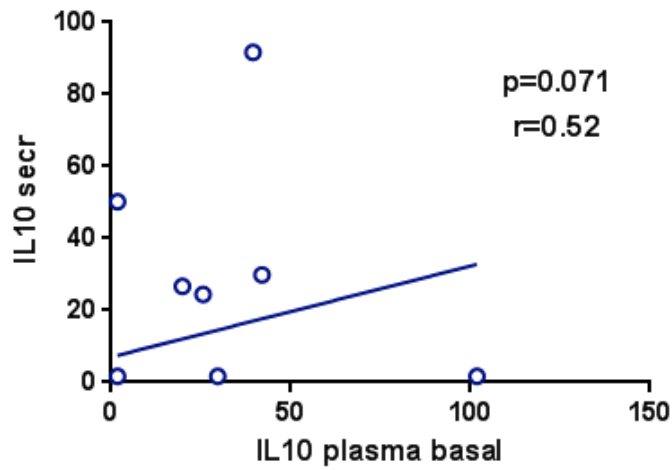


Figura 36.- Correlación positiva entre la IL10 en secreciones respiratorias y en plasma basal (pgr/ml).

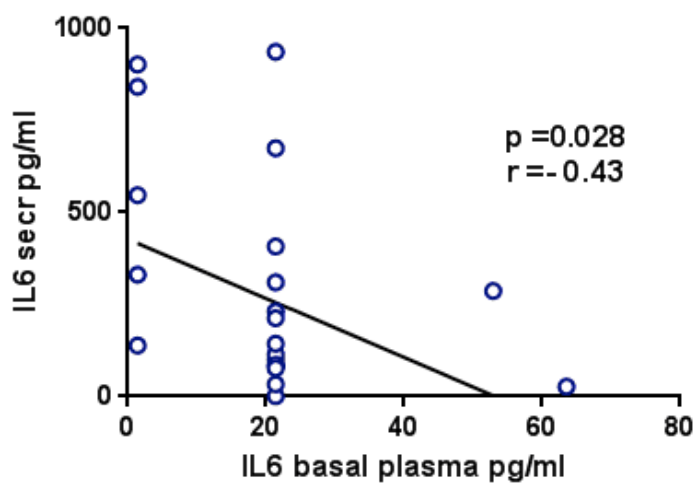


Figura 37.- Correlación negativa entre la IL6 en secreciones respiratorias y plasma basal.

### 5.3.10.- Curvas ROC de predicción de sibilancias recurrentes y de gravedad.

Dado que las concentraciones de TNF plasmático al mes eran significativamente mas elevadas en el grupo de lactantes con sibilancias recurrentes, y que la significación estadística tenía un valor de  $p=0.002$ , decidimos construir una curva ROC con un área bajo la curva de 0,81 con un IC del 95%: 0,64-0,97. Para un valor de TNF plasmático de 12,8 picogramos/ml se obtiene una Sensibilidad del 60% y una Especificidad del 94,5% (Figura 38). Se hizo lo mismo para TNF e IL 17 al mes de evolución, y el numero de episodios de sibilancias y se obtuvieron áreas de 0.98 tal y como se recoge en las Figura 39.

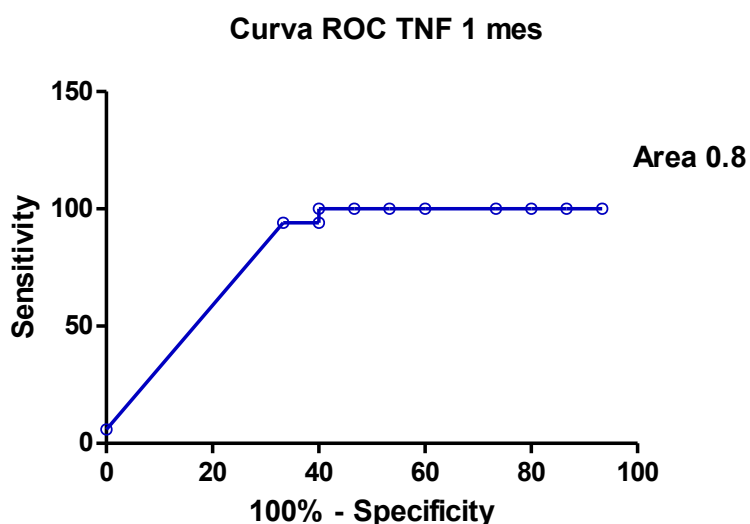


Figura 38.- Curva ROC para TNF plasmático a las 4 semanas de evolución



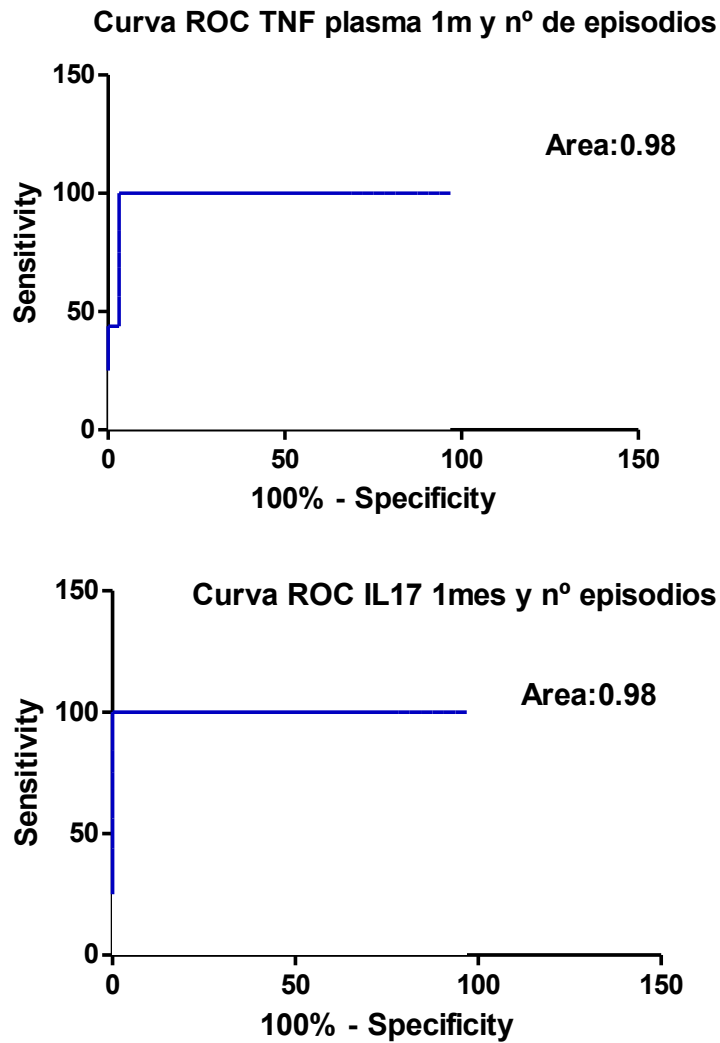


Figura 39.- Curvas ROC para TNF plasmático e IL17 a las 4 semanas de evolución y el número de episodios de sibilancias recurrentes

Asimismo se construyeron curvas ROC para las concentraciones de IL8 en secreciones respiratorias en el momento basal y el score de gravedad y los días de oxígeno con áreas bajo la curva de 0.96 como se recoge en la figura 40.

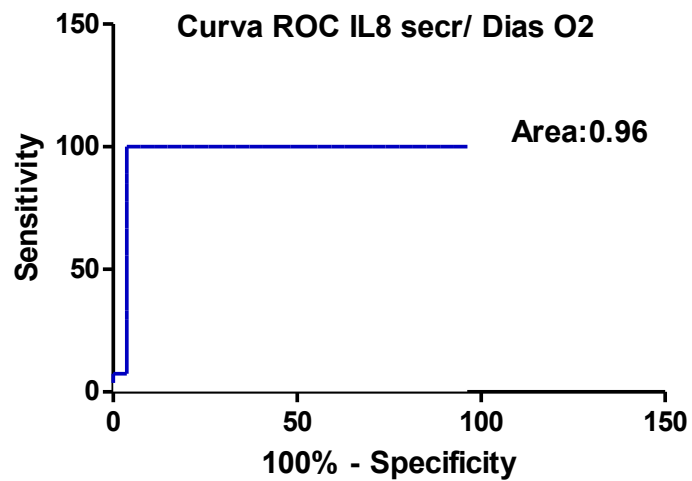
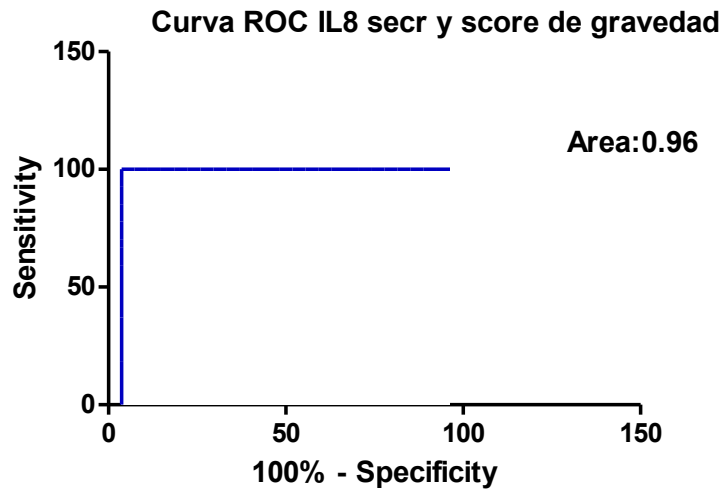


Figura 40.- Curvas ROC para IL 8 en secreciones respiratorias y días de O2.

## *Capítulo 6. Discusión*



## **6.1.- INTRODUCCIÓN**

El VRS es en la actualidad, el segundo patógeno en todo el mundo que mas muertes produce anualmente, tan solo después de la Malaria, representando aproximadamente el 5-7% de las muertes infantiles en todo el mundo <sup>172</sup>. Además en los últimos años en nuestro medio, estamos asistiendo a un incremento del número de ingresos hospitalarios debidos a la bronquiolitis. En un estudio realizado por García C y cols. en el Children's Southwestern Hospital of Dallas, entre los años 2002 y 2007, se observa como el número de pacientes ingresados por bronquiolitis en su centro aumenta desde 536 bronquiolitis en 2002 hasta 1241 bronquiolitis en 2007, lo que supone un aumento porcentual desde un 3,3% hasta un 5,5 %, diferencia que es estadísticamente significativa con un valor de  $p < 0.001$  (Figura 41)<sup>173</sup>. Los motivos por los que cada vez se diagnostican mas bronquiolitis no están claros, los expertos sugieren una exposición precoz al humo del tabaco, o quizás una exposición temprana a la guardería, o tal vez una mejor identificación y diagnóstico de los pacientes gracias al uso de los test rápidos diagnósticos y al uso de saturímetros en las urgencias pediátricas lo que permitiría identificar mejor, y probablemente antes a los lactantes más graves.

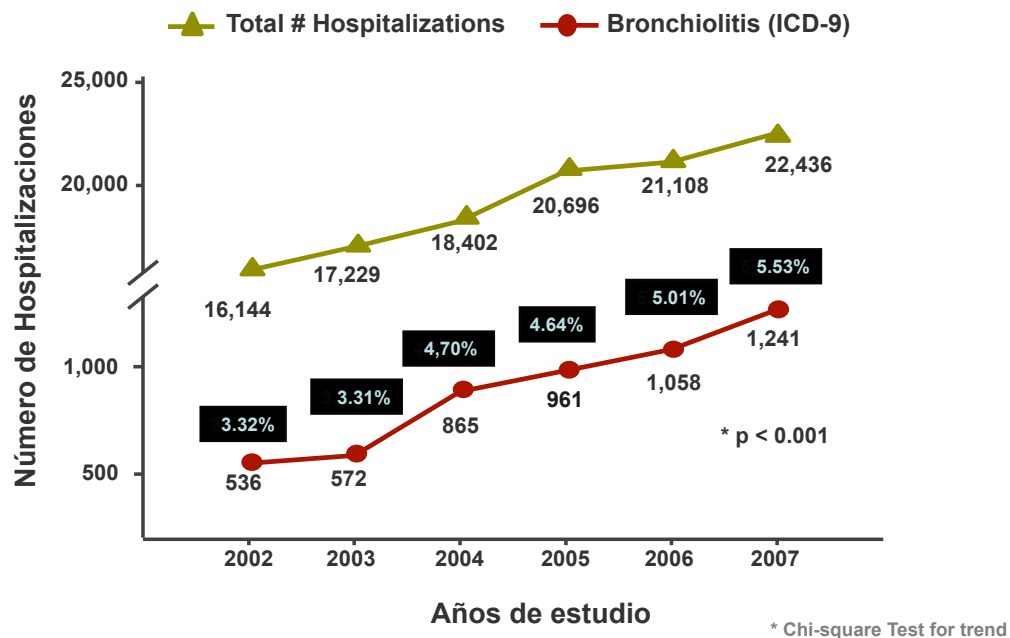


Figura 41.- Hospitalizaciones por bronquiolititis en el Children's medical Hospital en Dallas, Texas(EE.UU) entre 2002 y 2007 <sup>173</sup>.

Existen muchos datos y evidencias acerca de que entre un 40 y un 50% de los lactantes ingresados por bronquiolititis durante el primer año de vida, presentan sibilancias recurrentes en número de tres o más episodios durante los siguientes 24 meses <sup>174</sup>. Los mecanismos finales por los que el VRS puede inducir la presencia de sibilancias recurrentes postbronquiolititis aún no están bien descritos.

Esta tesis doctoral, profundiza precisamente en los mecanismos a través de los cuales el VRS puede inducir el desarrollo o no de sibilancias recurrentes, estudiando la respuesta inmune frente al virus. Se describe la respuesta mediada por citoquinas de la respuesta inmune Th1, Th2, Th17 y citoquinas proinflamatorias y se analizan las diferencias en las respuestas entre los lactantes con sibilancias recurrentes y aquellos que no presentaron tras el ingreso, sibilantes recurrentes.

Constituye, hasta donde sabemos, el primer trabajo de estas características en España puesto que mide evolutivamente durante 12 meses dichas respuestas en plasma. Los hallazgos encontrados concuerdan en buena medida con los encontrados en la literatura y contribuyen al conocimiento de este ámbito de la enfermedad, puesto que describe por primera vez la respuesta inmune frente a VRS al mes y al año de evolución y describe la relación existente entre las concentraciones de citoquinas en plasma y la recurrencia de sibilancias en los lactantes.

## **6.2.- IMPORTANCIA DEL VIRUS. TIPOS A Y B**

Algunos estudios epidemiológicos y moleculares, nos han proporcionado la secuenciación antigénica del VRS. Los virus circulantes se han clasificado en dos grupos antigénicos (A y B) que se relacionan con los grupos genéticos. La mayoría de las diferencias antigénicas intra e intergrupo se concentran en dos segmentos de la proteína G <sup>22</sup>. Generalmente, son secuencias del gen de la proteína G los que se usan para la realización de los análisis filogenéticos. Estos estudios demuestran una distribución a nivel mundial de ambas cepas del VRS que se van alternando a lo largo del tiempo. Aunque los datos aún son escasos y limitados, hay evidencias de que el tipo de VRS puede contribuir a explicar las diferencias en la gravedad y evolución de la enfermedad y que estas variaciones clínicas pueden ser en parte explicadas por la diferente respuesta inmune inducida por cada tipo de VRS <sup>175</sup>. Kong et al en 2001, publicaron que durante dos epidemias consecutivas de bronquiolitis por VRS co-circulan ambos subtipos y que en unas epidemias existe predominio del subtipo A, en otras epidemias predomina el subtipo B y en ocasiones coexisten de manera igualitaria y que algunos hallazgos vinculan la gravedad a algún subtipo de VRS. Además en Beijing la epidemia comienza antes en años alternos con máximos picos de incidencia en diciembre y enero y otros años y también de forma alternante, la epidemia comienza mas tarde con picos de incidencia en marzo o abril y curiosamente la circulación de subtipos A y B del VRS en esta ciudad sigue este mismo patrón, sugiriendo que las características epidemiológicas de ambos subtipos son diferentes.

Los genotipos del VRS se distribuyen a nivel mundial de forma que virus aislados en lugares muy distantes y en distintas epidemias, pueden ser más similares que otros virus aislados en sitios muy cercanos e incluso durante la misma epidemia. Es característico de las epidemias de VRS que coexistan varios genotipos de VRS y el genotipo preponderante varía en cada epidemia<sup>176</sup>. Así, en nuestra muestra, se comprueba la coexistencia de diferentes genotipos en cada una de las epidemias estudiadas.

Papadopoulos y cols en 2004, describieron que los lactantes con bronquiolitis VRS A tenían escalas clínicas de mayor gravedad que los lactantes infectados por VRS B<sup>177</sup>.

En 2008 Bermejo-Martin y colaboradores<sup>99 100</sup>, compararon en aspirados nasales la respuesta inmune de algunas citoquinas en pacientes con bronquiolitis por VRS A (14 pacientes) y B (8 pacientes) y otros 11 pacientes coinfectados por ambos A y B y otros virus respiratorios, respecto a 27 controles sanos. Encontraron que el perfil de liberación de citoquinas y mediadores inmunológicos en secreciones nasales, fue similar en los grupos de pacientes infectados por VRS A y B y tampoco encontraron diferencias respecto a los niños infectados por otros virus respiratorios.

En nuestra serie, no solo medimos citoquinas en lavado nasal sino también en plasma y hemos encontrado diferencias en las concentraciones de IFN gamma en el momento del ingreso, aunque no son significativas objetivando concentraciones mayores en plasma, en los lactantes infectados por VRS A que por VRS B. Estos niños infectados por el subgrupo A desarrollaron más frecuentemente sibilancias recurrentes postbronquiolitis que aquellos con infecciones por el VRS tipo B, y además en nuestra serie ninguno de ellos (los infectados por VRS B) presentaron sibilancias recurrentes. La fuerza de esta asociación es débil porque se trata de pocos pacientes por lo que estos datos habrá que confirmarlos, pero abre una interesante línea de investigación ya que este aspecto concreto de la infección por VRS no ha sido explorado en profundidad en la literatura.



De confirmarse estos hallazgos, el VRS A no solo produciría epidemias más graves sino que presentaría más frecuentemente una evolución peor y desarrollaría asma postbronquiolitis con mayor frecuencia.

### **6.3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DE LA SERIE**

Se analizaron 37 lactantes ingresados por un primer episodio de bronquiolitis por VRS y 10 controles sanos ingresados en el hospital por otros motivos no infecciosos, sobre todo realización de phmetrías y pacientes que estaban asintomáticos en ese momento desde el punto de vista respiratorio e inflamatorio. A todos los lactantes, se les realizó un test rápido de VRS y un cultivo celular, posteriormente se realizó una PCR viral. Los grupos fueron comparables en cuanto a edad, sexo y características epidemiológicas. Estos pacientes fueron seguidos durante 12 meses y se obtuvo que en el grupo de casos el 46% de los niños tuvieron sibilancias recurrentes y solo 1 de 10 (10%) en el grupo control, como está descrito en la literatura <sup>11 12 13</sup>. Esta diferencia resulta casi significativa ( $p=0.06$ ), y no lo es por el pequeño tamaño muestral.

### **6.4.- LA EDAD Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A VRS.**

Entre los factores de gravedad de la bronquiolitis por VRS, se encuentra la edad como factor determinante. De hecho, cuando se analizan las series de pacientes ingresados, se objetiva como la mayoría de ellos son pacientes menores de 3 meses de edad pero sin factores de riesgo, niños nacidos a término, sin cardiopatías de base ni otras malformaciones. Actualmente, es imposible saber con antelación que lactantes van a empeorar significativamente y cuales otros no lo harán. Por ello se considera la edad como un factor importante que puede determinar la evolución de la enfermedad.

Recientemente, se ha postulado que la respuesta inmune durante la infección por VRS depende de la edad <sup>178</sup>. Ichinohe y cols, demostraron que la capacidad para liberar IL4 e IFN gamma frente a la bronquiolitis por VRS aumenta con la edad. Chung y cols en otro estudio clínico, encontraron que los niveles de IFN gamma en sangre en las bronquiolitis por VRS, eran menores en los lactantes de menos de 6 meses de edad <sup>179</sup>.

Marr y colaboradores en 2014, han comparado los niveles de citoquinas frente a VRS en sangre en neonatos, en niños hasta 5 años de edad y en adultos, encontrando que en niños menores de 5 años, los niveles de IFN son significativamente menores que en los adultos. Estos hallazgos sugieren que la producción de IFN alfa, primariamente mediada por células dendríticas, es menos eficaz en épocas tempranas de la vida lo que podría contribuir a la susceptibilidad de los recién nacidos y los lactantes pequeños a la infección grave por VRS <sup>180</sup>.

Los lactantes menores de 3 meses son un grupo de riesgo para la bronquiolitis por VRS y se asocia con mayor morbi-mortalidad. Se ha sugerido que una menor liberación de mediadores inflamatorios en los lactantes mas pequeños podría explicar en parte esta predisposición a padecer una enfermedad más grave. Los mecanismos específicos por los que se produce esta diferente respuesta inflamatoria aún permanecen sin aclarar.

En esta dirección nosotros hemos analizado la respuesta inmune mediada por citoquinas en sangre y secreciones respiratorias en el momento basal, durante el ingreso hospitalario de todos los niños de la cohorte, independientemente de cual será a posteriori su evolución y la hemos estratificado según la edad. Queríamos investigar si existían diferencias en la respuesta de citoquinas frente a VRS entre los lactantes menores de 45 días y los mayores de esta edad. Hemos elegido este punto de corte porque coincide con la mediana de edad de la muestra.

En plasma, encontramos una menor respuesta de IFN gamma, como está descrito en la literatura, y en secreciones respiratorias concentraciones menores de TNF, IL 10 y de IL1B en los lactantes con edades iguales o

inferiores a 45 días de edad, diferencias que se mantienen hasta los dos meses de edad en el caso de la IL 1, y hasta los 3 meses de vida en lo referente a TNF e IL 10.

Estos hallazgos dan idea de la importancia de la edad en la respuesta inmune del huésped frente a este patógeno y como los más pequeños se defienden peor frente a la infección, lo que puede explicar, al menos en parte, la gravedad de la bronquiolitis por VRS en los lactantes menores de 45 días de edad<sup>179 180</sup>. Concluimos que los lactantes menores de 3 meses de edad, tienen una respuesta inmunológica frente a VRS diferente a los lactantes mayores, con menor liberación de IFN en plasma y niveles mas bajos de TNF, IL1 e IL 10 en secreciones respiratorias.

Además, es bien sabido que la bronquiolitis por VRS, afecta a lactantes más jóvenes que la bronquiolitis por otros virus<sup>180 181</sup>. En las series históricas de nuestro Hospital recogimos datos epidemiológicos de pacientes ingresados entre los años 2006 y 2010 y comparamos los lactantes ingresados por bronquiolitis por VRS con los lactantes diagnosticados de bronquiolitis por otros virus y encontramos que los niños con bronquiolitis por VRS eran menores en edad (5,02 meses respecto a 6,95 meses  $p < 0.001$ ) al igual que ocurre en la serie de García C y cols<sup>88</sup> ( Figura 42).

## Características de los Pacientes (HGUGM 2008-2012)

Epidemiología		VRS (n=487)	No-VRS (n=479)	Valor p
	Sexo	V/M 1.4:1	V/M 1.5:1	0.5
	Edad (meses)	5.02 (0.3-24)	6.95 (0.5-24)	<0.001
FR	Prematuridad	69 (14%)	73 (15.2%)	0.6
	Cardiopatía	30 (6%)	19 (3.9%)	0.19
	DBP	4 (0.8%)	10 (2%)	0.078
TTO	UCIP	40(8.2%)	23(4,8%)	<0.05
	Intubación	17(3.4%)	8(1.6%)	0.05

Figura 42.- Características epidemiológicas de nuestras cohortes históricas de bronquiolitis.

Además, aquellos pacientes con bronquiolitis por VRS, estaban más graves puesto que necesitaron mas ingreso en UCIP y mayor porcentaje de intubación que la cohorte de lactantes con bronquiolitis por otras etiologías. Si la gravedad de estos niños, dependió solamente de la edad del huesped o del patógeno, aún no esta demostrado aunque lo que es indudable es que la edad juega un papel en esta ecuación.

## **6.5.- EL GÉNERO Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A VRS**

En numerosos estudios se ha relacionado el género masculino con una mayor gravedad de la bronquiolitis por VRS, sin embargo no están bien descritas las diferencias entre las concentraciones de las citoquinas plasmáticas durante la infección y el género. En 2006, Nagayama publica un estudio sobre 90 lactantes varones y 51 niñas con bronquiolitis por VRS para establecer diferentes respuestas inflamatorias entre ellos, y encontró que las niñas tenían un conteo superior de leucocitos y de Proteína C reactiva (PCR) que los niños, mientras que la eosinofilia en el esputo era mas elevada en los varones. Los autores especulan que existen diferencias de género en la respuesta immune frente a VRS, que explicarían la mayor gravedad en los varones y además sugieren investigar las diferentes respuestas inmunes genero-especificas y la progresión a asma <sup>181</sup>.

Nosotros hemos encontrado una diferencia casi significativa ( $p=0.051$ ) en las concentraciones de IFN gamma en plasma entre varones y mujeres, con una concentración mayor en varones que podría explicar la mayor gravedad de la enfermedad en este grupo de lactantes. La diferencia descrita roza la significación estadística y habrá que confirmarla en posteriores estudios, porque muy probablemente esté en relación con el tamaño muestral. La importancia de este hallazgo, si se confirma, es que se describe un mecanismo que puede explicar la mayor gravedad de la bronquiolitis VRS en los varones. De Vincenzo y cols ya describieron una mayor carga viral en los varones, hecho que también podría contribuir a la mayor gravedad de la bronquiolitis en los niños respecto a las niñas <sup>181</sup>.

## 6.6.- LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A VRS

C Mella y colaboradores, en 2013, publicaron que las concentraciones plasmáticas de IL6,8 y 10 estaban significativamente mas altas durante la fase aguda en pacientes infectados por VRS comparados con los controles sanos y fueron mas allá demostrando que una respuesta inflamatoria disminuida en los pacientes con bronquiolitis por VRS puede condicionar la gravedad de la enfermedad <sup>90</sup>.

En 2010 Grzesk, en Polonia <sup>182</sup> sugiere en sus resultados en 23 lactantes ingresados por bronquiolitis por VRS, que las IL5, IL8 e IFN participan en la génesis de la respuesta inflamatoria durante la bronquiolitis en niños, ya que objetivaron un incremento de los niveles de estas interleuquinas en sangre junto con una disminución de la actividad de CD4, CD8 y Natural Killers.

Otros autores como Van Schaik, Bont, Wang, y Castro <sup>137 183 128 130 114</sup> describieron previamente, que durante la infección por VRS se activa la cascada inflamatoria lo que conlleva a la activación de los linfocitos Th1 y Th2 y se observa un aumento de IL2,6,10 y 13 junto con una disminución en las concentraciones de IFN gamma e IL4. Sin embargo durante las bronquiolitis por otros virus diferentes al VRS predomina una respuesta Th1 con elevación de IFN gamma en sangre periférica.

Nuestros resultados, también demuestran que las concentraciones de citoquinas en sangre y secreciones respiratorias en lactantes con bronquiolitis por VRS son diferentes que en los controles sanos; en este caso encontramos que los niveles de IFN gamma son significativamente más elevados en el plasma de la muestra basal en los casos que en los controles y en la muestra del mes de evolución las concentraciones de IFN, TNF, IL17 e IL 6 son mas elevadas en los casos que en los controles. Esto explica, como el VRS condiciona la respuesta inmunológica del huesped y como el IFN gamma, representando a la respuesta inmune Th1, participa en la génesis de la respuesta inmunológica y también inflamatoria frente a VRS en lactantes sanos.

## **6.7.- LA GRAVEDAD DE LA BRONQUIOLITIS Y SU RELACIÓN CON LAS CONCENTRACIONES DE CITOQUINAS.**

¿De qué factores depende la gravedad de la bronquiolitis por VRS? Esta pregunta aún hoy en día permanece sin respuesta.

Aunque está claro que algunos factores como la edad o la presencia de enfermedades subyacentes sí puede condicionar la gravedad de la enfermedad, sin embargo la mayoría de pacientes que empeoran y necesitan ingreso en UCIP son pacientes previamente sanos sin enfermedades de base. Se han sugerido numerosas causas que pueden condicionar la gravedad de la enfermedad: la carga viral, la existencia o no de coinfecciones, los niveles de vitamina D en sangre, la susceptibilidad genética o la intensidad y calidad de la respuesta inmune y la interacción entre el huésped y el virus <sup>82 90 97</sup>.

Respecto a la calidad e intensidad de la respuesta inmune y la gravedad, Mejías y Ramilo han publicado que una "inmunoparálisis" en la respuesta inflamatoria frente a VRS es lo que explicaría la gravedad de la bronquiolitis, de una manera similar a lo que ocurre en las sepsis bacterianas, donde una menor respuesta con menor leucocitosis o menos parámetros inflamatorios en LCR o sangre se asocian con peor evolución de la enfermedad <sup>90</sup>.

Se ha propuesto que la combinación de factores del virus y factores del huésped son los que explicarían la gravedad de la enfermedad <sup>88 91 92</sup>.

La importancia de la respuesta inmune en la patogenia de la enfermedad grave por VRS, ha hecho que se focalice la investigación en las concentraciones plasmáticas de citoquinas con pobres resultados. El estudio de Mella y cols demuestra que los pacientes críticamente enfermos con bronquiolitis por VRS ingresados en UCIP tienen concentraciones plasmáticas de citoquinas proinflamatorias levemente aumentadas comparados con pacientes con bronquiolitis VRS leves-moderadas <sup>90</sup>. Además, demuestran que la capacidad de liberación de TNF e IL8 esta afectada en estos pacientes graves y que estos niveles disminuidos son factores predictores independientes de gravedad.

Existen varios estudios publicados que tratan de establecer una relación entre la gravedad del VRS y las concentraciones séricas de ciertas citoquinas con resultados contradictorios <sup>184 185 186</sup>.

En 1999, Bont y cols investigaron la asociación entre la respuesta sistémica de IL en pacientes con bronquiolitis por VRS ventilados y no ventilados. Midieron citoquinas en la fase aguda de la enfermedad y en la fase de convalecencia a las 4 semanas tras el ingreso. Los pacientes ventilados en UCIP tenían concentraciones mas bajas de TNF e IL 4, mientras que la IL8 estaba elevada en pacientes ventilados. En la fase de convalecencia los niveles de TNF, IL4 e IL8 se normalizaron en todos los casos. No encontraron diferencias en las respuestas Th1 y Th2 en fase aguda o de convalecencia. Así encontraron que niveles bajos de TNF e IL4 y niveles elevados de IL8 en plasma en fase aguda se asocian con gravedad de la bronquiolitis por VRS <sup>187</sup>.

En nuestro estudio se establecieron correlaciones entre las citoquinas más significativas (IFN, TNF, IL10, IL8 e IL17) y algunos parámetros de gravedad como la puntuación del score de gravedad, la estancia media y el número de días de oxígeno. En el momento basal encontramos una correlación positiva entre la concentración de IL 8 basal en plasma y la estancia media, de forma que cuanto mayores son las concentraciones de IL 8 en plasma en el momento del ingreso mayor es la estancia media. Este hallazgo, de confirmarse, nos permitiría predecir la estancia media de los pacientes. Traduce además que aquellos pacientes con mayor inflamación son los que van a tener mayor estancia media y por lo tanto, mayor gravedad.

Además encontramos que cuando la bronquiolitis por VRS es más grave con scores iguales o superiores a 8 los niveles plasmáticos de TNF en el momento basal son significativamente mayores a diferencia de lo que ocurre en el estudio de Mella y cols, si bien, a pesar de estos resultados, en nuestro caso no se ha podido demostrar que el TNF sea un factor predictor independiente de gravedad como si lo ha hecho el grupo americano, lo que indica una menor potencia estadística en nuestros resultados.



En las muestras extraídas al mes del alta de la bronquiolitis, encontramos correlaciones significativas positivas entre la puntuación del score de gravedad y los niveles de IFN, también significativa entre los niveles plasmáticos de IL10 y los días de oxígeno durante el ingreso hospitalario.

Igualmente se detectó una correlación positiva entre los niveles de IL10 plasmática al mes de evolución y la estancia media; así aquellos lactantes que tuvieron una estancia mayor en número de días en el hospital son precisamente aquellos lactantes con niveles plasmáticos mas elevados de IL10 con una  $r=0,354$  y una  $p= 0,047$ . En las muestras de sangre extraídas en la fase de convalecencia al año encontramos correlaciones entre los niveles plasmáticos de TNF, IL 10, 6, e IL 17 y el numero de episodios de sibilantes recurrentes con significación estadística en todos los casos. Así para el TNF encontramos una correlación positiva con una  $p=0,013$  y  $r=0,482$ .

Así, los pacientes que precisaron más días de oxígeno y con mayor estancia media tuvieron niveles mas elevados de IL10 al mes de evolución. Aquellos lactantes con sibilancias recurrentes tuvieron niveles elevados de IL17 y TNF al mes y de IL17 e IFN al año.

Las correlaciones encontradas en las fases de convalecencia al mes y al año entre ciertas IL y la gravedad de la bronquiolitis aunque no permiten predecir que pacientes empeoraran y cuales no, si permiten documentar una relación entre las concentraciones de citoquinas y la gravedad de la infección que persiste incluso mas allá del mes de evolución. Es decir, los lactantes que tuvieron bronquiolitis más graves por VRS presentaron también mayor alteración inmunológica y de mayor intensidad y duración puesto que se mantiene en las fases de convalecencia precoz y tardía.

Cuando se analizaron estos datos en relación con los niveles de citoquinas en secreciones respiratorias en el momento basal, se encontró una correlación positiva entre los niveles de IL8 y la puntuación del score de gravedad, de forma que los niveles de IL8 en moco durante la fase aguda de una bronquiolitis por VRS pueden predecir la gravedad de la enfermedad con una  $r=0,424$  y una  $p =0,027$ .

De nuestro estudio se desprende que las concentraciones de IL8 en secreciones respiratorias y en plasma en el momento del ingreso, pueden predecir la gravedad de la enfermedad, este hallazgo concuerda con los datos de Bont respecto a los niveles de IL8 en suero y la gravedad de la enfermedad; si bien en el momento actual no se sabe la correlación existente entre los niveles de las interleuquinas en plasma y en secreciones respiratorias. Smyth y cols encontraron una asociación entre la cantidad de IL-8 producida localmente en las vías aéreas y cuantificadas por RNAm y la gravedad de la infección por VRS al igual que ocurre en nuestros resultados<sup>188</sup>. Es muy interesante el papel de esta citoquina inflamatoria en la bronquiolitis por VRS puesto que esta involucrada en la gravedad y evolución de la enfermedad, permite predecir la estancia media y el score de gravedad de cada paciente y además permite predecir que pacientes van a desarrollar asma y cuales no. Además, la IL 8 atrae neutrófilos durante la fase aguda de la bronquiolitis lo que podría explicar en parte la mayor gravedad y la peor evolución de aquellos pacientes en los que las concentraciones de IL8 están más elevadas. Existe entonces correlación entre las citoquinas y la evolución y gravedad de la enfermedad y estos hallazgos contribuyen a conocer aspectos de la respuesta inflamatoria de la infección por VRS que de alguna forma condicionan la gravedad de la enfermedad.

Sería crucial identificar un marcador precoz que pudiera prever la gravedad y la evolución de la bronquiolitis para poder aplicar medidas terapéuticas y profilácticas precoces, tal vez si estos resultados se confirman, la IL8 en secreciones respiratorias y en plasma en el momento del ingreso hospitalario pueda predecir el curso evolutivo de cada paciente.

#### **6.8.- RELACION ENTRE EL HEMOGRAMA, LOS NIVELES DE IL Y EL DESARROLLO DE SIBILANCIAS POSTBRONQUIOLITIS**

Existe una lista creciente de virus y bacterias que se relacionan con el desarrollo de sibilancias recurrentes y asma y actualmente se están intentando desentrañar los mecanismos por los que estos patógenos son capaces de causar asma. El consenso actual sostiene que la infección, sobre todo vírica,

junto con los mecanismos alérgicos producen las condiciones inmunológicas y fisiológicas necesarias para el desarrollo de asma.

Los eosinófilos constituyen un vínculo claro entre la infección y el asma pues juegan un papel crucial en el asma y la alergia, pero también se encuentran elevados en algunas infecciones. Hasta ahora, el VRS ha sido el foco principal de atención en este sentido. No hay estudios publicados que demuestren una relación directa entre VRS y asma, pero un estudio a largo plazo sobre 95.000 niños encontró que si el nacimiento de los niños se produce en invierno, 4 meses antes del pico máximo de incidencia del VRS el desarrollo de asma es mayor que si el nacimiento ocurre en otras épocas del año, y además la utilización de anticuerpos monoclonales frente a VRS (palivizumab) en niños con enfermedad pulmonar crónica mejora la función pulmonar y disminuye el riesgo de asma y atopia lo que sugiere que la prevención de la infección por VRS podría tener efectos a largo plazo en el desarrollo de asma <sup>189 190 191</sup>. Recientemente, en 2013 Blanken y cols en el estudio MAKI, publicaron que en recién nacidos pretérminos sin otra patología añadida, el uso de palivizumab producía una disminución de los días de sibilancias durante el primer año de vida lo que indica que el VRS es un mecanismo muy importante en la producción de sibilantes recurrentes en el primer año de vida en estos lactantes <sup>192</sup>.

En nuestro trabajo, hemos intentado relacionar la eosinofilia en algún momento de la evolución de la enfermedad y el desarrollo de sibilancias recurrentes y encontramos que los lactantes que desarrollaron sibilancias tuvieron un número mas elevado de eosinófilos en la muestra de la convalecencia a los 12 meses del seguimiento comparado con aquellos

lactantes que no desarrollaron sibilantes y esta diferencia fue significativa, sin embargo no encontramos diferencias en cuanto a otras células sanguíneas como neutrófilos o linfocitos. Tampoco encontramos diferencias en el momento basal o al mes de evolución en cuanto a los eosinófilos.

Estos hallazgos sugieren que en el subgrupo de lactantes con sibilantes recurrentes, algo ocurre durante los 12 meses de seguimiento que hace que los eosinófilos vayan aumentando y seguramente estas células juegan algún

papel en el desarrollo o mas bien en el mantenimiento de las sibilancias recurrentes tras la infección por VRS.

Berry y cols en 2010, describieron por primera vez que la respuesta inmune frente tuberculosis esta mediada por IFN alfa y gamma impulsado por los neutrofilos, definiéndose así la relación entre los neutrofilos y el interferón <sup>193</sup>. En este sentido, hemos encontrado en bronquiolitis por VRS una relación entre IFN gamma y neutrofilia en sangre periférica y la misma relación con IL8 plasmática. El modo en que los neutrófilos se relacionan con los niveles plasmáticos de IFN gamma e IL8 durante la infección por VRS, si estimulan o modulan la liberación de estos mediadores no está bien estudiado hoy en día, y constituye un interesante campo de investigación. Además, cada vez hay mas evidencias acerca del importante papel que juegan los neutrofilos en la infección por VRS; al principio se creía que eran los linfocitos y quizás también los eosinófilos los principales actores en esta infección, sin embargo ahora se sabe que son los neutrofilos y las células dendríticas los que también están muy involucrados en la respuesta del organismo frente a VRS.

## **6.9.- INTERACCIÓN VIRUS-HUÉSPED. LA RESPUESTA INMUNE EN RELACIÓN A LA BRONQUIOLITIS VRS Y LAS SIBILANCIAS RECURRENTE.**

La bronquiolitis por VRS se considera una causa importante de sibilancias recurrentes en los lactantes, aunque la relación entre la infección por VRS y el asma aún no esta bien aclarada <sup>190</sup>.

### **6.9.1.- La IL 10 y las sibilancias recurrentes**

Numerosos estudios animales sugieren que la IL10 juega un papel importante en la patogenia de las sibilancias recurrentes postbronquiolitis <sup>194 195</sup>. Clásicamente, la IL 10, se consideraba un mediador inflamatorio propio de la respuesta inmune Th2, si bien recientemente se engloba dentro de la respuesta Th10, y además la IL 10 puede regular y modular de alguna manera la producción de citoquinas de las células Th1 y Th2 <sup>196</sup>.

En niños infectados por VRS, los niveles de IL 10 están elevados en secreciones respiratorias mientras que generalmente están disminuidos en niños atópicos y con asma <sup>197</sup>. Además los niveles elevados de IL10 se han correlacionado con pacientes con hipoxia durante la bronquiolitis <sup>198</sup>.

L. Bont y colaboradores en el año 2000 <sup>128 129</sup> realizaron un estudio observacional en 50 lactantes hospitalizados por bronquiolitis y los estudiaron en la fase aguda y en la convalecencia entre 3 y 4 semanas tras el alta y los siguieron durante un año para evaluar el desarrollo de sibilancias postbronquiolitis. Encontraron que en la fase de convalecencia la IL10 esta significativamente más elevada que en los controles sanos. El 58% de sus pacientes desarrollaron asma postbronquiolitis y los niveles de IL10 fueron significativamente mas elevados en el grupo de lactantes sibilantes, hallazgos muy similares a los encontrados en esta tesis si bien en nuestro trabajo se investigaron además otras citoquinas como IL2, 8 17 y TNF encontrándose la misma relación. Además en el trabajo de Bont <sup>128 129</sup> encuentran una correlación positiva entre los niveles de IL10 en sangre en la fase de convalecencia y el número de episodios de sibilantes, como ocurre en nuestro trabajo, aunque en nuestro caso, se amplían estas correlaciones a otras citoquinas como TNF, IL6 y 17. En este artículo Bont y cols no encuentran asociación entre las concentraciones de IL12 a las 4 semanas de evolución y el desarrollo de sibilantes recurrentes, sin embargo, en nuestro trabajo, encontramos dicha correlación con valores estadísticamente significativos. En el estudio holandés, los autores sugieren que esta asociación entre IL10 a las 4 semanas del alta tras una bronquiolitis por VRS y el desarrollo de sibilancias recurrentes quizás se pierdan posteriormente en la evolución de los pacientes, sin embargo ellos no recogieron muestras mas allá del mes de evolución <sup>128 129</sup>. En esta tesis se comprueba como la asociación IL 10 y las sibilancias recurrentes va mas allá del primer mes de convalecencia, manteniéndose sorprendentemente hasta 12 meses tras el ingreso hospitalario, momento en que aún se mantiene la diferencia, con valores estadísticamente significativos.

Schuurhof y cols en 2011 estudiaron el papel de la IL10 en la patogénesis de la bronquiolitis y en el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes. En 250 lactantes hospitalizados por bronquiolitis por VRS, midieron las concentraciones de IL10 en aspirado nasal y obtuvieron datos de seguimiento

durante un año en 185 pacientes. Encontraron que los niveles de IL10 local en aspirado nasal fueron significativamente más altos en lactantes que desarrollaron sibilancias recurrentes y especulan con la posibilidad de que estas concentraciones permanezcan elevadas incluso meses después <sup>198</sup>, hallazgo confirmado en plasma en esta tesis.

En resumen, la IL10 pertenece al grupo de mediadores inflamatorios que constituyen la respuesta inmune Th2 ó Th10 que se ha involucrado en la literatura en numerosas ocasiones en el desarrollo de asma, alergia y sibilancias recurrentes. Está descrita la implicación de la IL10 en el desarrollo de asma tras una infección vírica respiratoria, sin embargo, son pocas las referencias en la literatura sobre su elevación en fase de convalecencia un mes tras el alta hospitalaria y no existen, hasta donde sabemos, publicaciones un año tras el ingreso inicial, en los niños con bronquiolitis por VRS que desarrollaron sibilancias recurrentes.

No hemos encontrado en la literatura ninguna descripción de la elevación de este mediador inmune en plasma en las fases tardías de convalecencia tras una infección VRS y su relación e implicación en el desarrollo de asma postbronquiolitis.

#### **6.9.2.- La IL 17 y las sibilancias recurrentes.**

La IL17 pertenece a la respuesta inflamatoria Th17 y está generalmente involucrada en procesos autoinmunes y en el desarrollo de asma grave. Sin embargo, el papel de la IL 17 en el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis no está bien descrito.

En modelos animales en ratón, se ha observado un incremento de los niveles de IL 17, 6 y 23 en pulmón. El papel de la IL17 en la respuesta alérgica de la vía aérea tras una infección por VRS se está investigando y parece que la neutralización de IL17 conlleva una disminución significativa de las exacerbaciones, incluso de la producción de mucosidad y de los niveles de citoquinas Th2. La infección por VRS induce hiperreactividad bronquial e hiperproducción de moco en roedores e induce neutrofilia en el pulmón en

animales de experimentación. Aunque la IL17 parece que juega un papel importante en el desarrollo de asma regulando la expresión genética en la vía aérea, su rol concreto en la respuesta patogénica durante la bronquiolitis VRS no se conoce bien <sup>167</sup>. La IL 17 modula tres mecanismos importantes en la bronquiolitis:

- La hiperproducción de moco en la vía aérea,
- La alteración de la respuesta celular T CD8 y
- El aclaramiento viral.

Cada uno de estos mecanismos puede contribuir al desarrollo de patología pulmonar. Además la IL 17 liberada durante la fase aguda de la infección, puede contribuir al desarrollo de hiperreactividad bronquial postbronquiolitis <sup>199</sup>. En resumen, la IL17 tiene efectos perjudiciales pero también beneficiosos durante la infección por VRS; la IL17 induce patología pulmonar y atrae a los neutrófilos, induce la producción de moco y la liberación de IL13. Los efectos beneficiosos de la IL17 durante la bronquiolitis por VRS están aún debatiéndose pero parece que puede tener un efecto antiviral <sup>200</sup>.

Los hallazgos de esta tesis confirman en parte esta hipótesis, puesto que se comprueba la importancia de la IL17 en la respuesta inmune frente a VRS en las fases de convalecencia y como, de alguna manera, puede contribuir a la génesis y mantenimiento de las sibilancias recurrentes. Encontramos elevación significativa de IL 17 en sangre 4 semanas después de la infección aguda en lactantes que van a desarrollar sibilantes y esta elevada concentración mantiene su significación estadística hasta 12 meses tras el alta hospitalaria. Además, la concentración de IL 17 en la fase de convalecencia precoz y tardía se correlaciona de forma significativa con el número de episodios de sibilantes que han desarrollado los lactantes, lo que nos hace pensar que esta citoquina juega un relevante papel en el desarrollo de asma postbronquiolitis.

### **6.9.3.- La IL 8 y las sibilancias recurrentes**

La IL-8 es una citoquina inflamatoria, con actividad quimiotáctica para neutrófilos, su relación con la gravedad de la infección es controvertido. Smyth y cols encontraron una asociación entre la cantidad de IL-8 producida localmente en las vías aéreas y cuantificadas por RNAm y la gravedad de la infección por VRS <sup>201</sup>. En cambio, Bennett y col encontraron un aumento significativo en el aspirado nasofaríngeo de ILs proinflamatorias pero que no tenía relación con la gravedad de la enfermedad ni con la presencia del VRS <sup>87</sup>. En el presente trabajo, se ha encontrado una correlación positiva entre la concentración de IL8 local en secreciones respiratorias y la puntuación del score de gravedad así como una correlación positiva entre las concentraciones de IL8 en plasma basal y la estancia media, por lo que esta interleuquina podría considerarse un marcador de predicción de gravedad de la bronquiolitis. Sin embargo, no se han descrito asociaciones entre la IL8 en plasma en el momento basal y el desarrollo de sibilancias. Sí hemos encontrado concentraciones plasmáticas elevadas en el grupo de niños que desarrollaron sibilancias recurrentes tras la bronquiolitis, de forma que puede ser también, junto con TNF, IL10 e IL17 un marcador precoz que nos permita en el futuro el diagnóstico de lactantes que van a padecer asma postbronquiolitis. Así pues la IL 8 está relacionada con la gravedad y evolución de la infección por VRS tal y como demuestra nuestro trabajo de investigación y proponemos que se podría considerar la determinación de IL8 en secreciones respiratorias como marcador de gravedad de la bronquiolitis en el momento del ingreso hospitalario.

Otro aspecto importante de la IL 8 en plasma durante la fase aguda de la bronquiolitis por VRS es su relación con el número de neutrófilos. Así, cuanto mayor es la concentración de IL8 plasmática mayor es el conteo de neutrófilos, quizás porque esta IL es capaz de atraer a los neutrófilos durante la infección por VRS traduciendo por tanto una importante inflamación, no solo local sino también a nivel sistémico.



#### **6.9.4.- El TNF y las sibilancias recurrentes**

El TNF es una citoquina proinflamatoria, con numerosas funciones sobre las respuestas inmunes. Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF-alfa y el TNF-beta, con elevada homología en su secuencia aminoacídica. El TNF-alfa es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el LPS, siendo esta citocina el principal responsable del shock séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos. Junto con la IL-1 está implicado en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos víricos. Forma parte de la respuesta inmune Th1.

En 1994, Balfour-Lynn, describieron en lactantes con sibilancias recurrentes, niveles elevados de TNF en lavados nasales durante los episodios de sibilancias sugiriendo que TNF esta involucrado en el desarrollo de sibilancias recurrentes en la lactancia <sup>202</sup>. Posteriormente Azevedo en 1997 demuestran que los macrófagos alveolares de lactantes con sibilancias recurrentes espontáneamente liberan cantidades elevadas de TNF comparado con controles sanos incluso en los periodos asintomáticos <sup>203</sup>.

La importancia de esta citoquina de la respuesta Th1 durante la fase aguda de la bronquiolitis por VRS y su papel crucial en la génesis y desarrollo de asma postbronquiolitis queda bien reflejada en esta tesis doctoral. En primer lugar, hemos sido capaces de describir el papel del TNF en la respuesta inmune del huésped frente a VRS puesto que cuanto mas jóvenes son los lactantes estudiados, menos concentraciones de TNF presentan en secreciones respiratorias explicando en parte la gravedad de la enfermedad. Además, a las 4 semanas del seguimiento los niveles mas elevados de TNF en plasma, se asocian con el desarrollo de sibilancias recurrentes como sugieren los estudios de Azevedo y Balfour-Lynn y las concentraciones de TNF a los 12 meses de seguimiento se correlacionan con el número de episodios de sibilancias que padeció cada lactante.

En lo que respecta a la gravedad de la infección, hemos descrito que en las bronquiolitis más graves con score de gravedad igual o mayor a 8, las concentraciones plasmáticas de TNF durante el ingreso hospitalario, son significativamente más elevadas que en aquellos lactantes con scores de gravedad inferiores a 8.

En nuestro estudio sugerimos la importancia del TNF alfa en el desarrollo de asma postbronquiolitis, y su papel en la respuesta inmune frente a VRS según la edad del paciente. Así, en los menores de 45 días de vida, las concentraciones de TNF en plasma en el momento basal son significativamente menores que en los mayores de 45 días de edad; además encontramos que en los casos infectados por VRS la respuesta en cuanto a la liberación de TNF es mucho mayor que en los controles incluso meses después del ingreso hospitalario. Hay varios artículos en la literatura, que describen que concentraciones mas bajas de TNF en suero se relacionan con la infección por VRS en el momento agudo, sin embargo nosotros encontramos que una elevación del TNF en plasma al mes de evolución se relaciona con el desarrollo de sibilancias y que este mediador se mantiene elevado hasta 12 meses después del ingreso.

Así, en la fase de convalecencia aguda (al mes de evolución ) el TNF es uno de los mediadores inflamatorios que nos permiten predecir el desarrollo de sibilancias persistentes e incluso más, el numero de episodios de sibilancias persistentes.

#### **6.9.5.- El IFN y las sibilancias recurrentes**

El IFN es una proteína liberada por el sistema inmune como respuesta a agentes patógenos, tales como virus y células cancerígenas. Se trata de una citocina de la respuesta inmunológica Th1<sup>156 157</sup>. Se unen a receptores en la superficie de las células infectadas, activando diferentes vías de señalización en las que participan diversas proteínas antivirales (como la PKR), para impedir la replicación de una amplia variedad de virus de ARN y ADN. Cumplen, además, otras funciones: activan células inmunes, como los macrófagos y las células NK; incrementan el reconocimiento de células

cancerígenas o infecciones al dinamizar la presentación de antígenos a los linfocitos T y, finalmente, incrementan la capacidad de las células sanas para resistir a nuevas infecciones víricas <sup>156 157 158 159</sup>. En la mayoría de casos, la producción de interferón es inducida por otras citocinas, por ejemplo, IL-1, IL-2 y TNF, que son sintetizadas en respuesta a la aparición de virus en el cuerpo. Su metabolismo y excreción se produce principalmente en el hígado y riñones. El interferón alfa y beta es producido por varios tipos celulares: las células T y las células B, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y osteoblastos entre otras, y son importantes componentes de la respuesta antiviral. Estimulan a los macrófagos y las células NK y son activas contra los tumores. El interferón gamma participa en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria. En los humanos, sólo hay un tipo de interferón gamma. Se produce en células activadas. El interferón gamma tiene efectos antivirales y antitumorales, pero generalmente débiles <sup>204</sup>.

El interferón gamma es segregado por las células Th1 y atrae leucocitos al punto de infección, dando como resultado una inflamación. También estimula a los macrófagos para eliminar bacterias que han sido fagocitadas. Este interferón es también importante en la regulación de la respuesta de las células Th2. Al estar íntimamente relacionado con la respuesta inmunitaria, su producción puede derivar en desórdenes inmunitarios <sup>205</sup>.

Nosotros hemos encontrado que el IFN gamma es una de las citoquinas más involucradas en el desarrollo a medio y largo plazo de sibilancias recurrentes en la bronquiolitis por VRS, y a la vez hemos descrito una asociación entre las concentraciones de IFN gamma en plasma durante la fase aguda de la infección y la neutrofilia, como también ocurre con la IL8. Probablemente, lo que ocurre es que el IFN atrae a los neutrófilos durante la bronquiolitis por VRS traduciendo inflamación.

Un hallazgo interesante de esta tesis es que en los menores de 45 días los niveles de IFN gamma son mas bajos que en los niños mayores sugiriendo una respuesta inmune defectuosa en los lactantes mas pequeños.

En la fase aguda de la infección por VRS una de las citoquinas que antes se diferencian en los casos enfermos respecto a los controles sanos es el IFN gamma, con niveles mas elevados en el grupo de los casos. Aún mas, cuando comparamos los casos enfermos con los controles sanos y diferenciamos entre aquellos casos infectados por VRS que van a desarrollar sibilancias recurrentes y aquellos que no, encontramos que la diferencia de concentraciones de IFN en plasma respecto a los controles ocurre principalmente entre los casos que van a desarrollar sibilancias recurrentes. ( Figura 19)

Esta citoquina se relaciona con el desarrollo de sibilantes postbronquiolitis y con el número de episodios de sibilancias a lo largo del año de seguimiento y también con las puntuaciones de los scores de gravedad. De forma que todas estas observaciones nos hacen pensar en el importante papel del IFN gamma en la respuesta del organismo frente a VRS tanto a corto como a largo plazo y su papel en la génesis de la respuesta inmune frente a VRS.

#### **6.9.6.- Evolución temporal de las concentraciones de citoquinas y el desarrollo de sibilancias recurrentes**

Pino y cols en 2009 <sup>99</sup> realizaron un estudio evolutivo sobre 20 niños menores de 2 años de edad hospitalizados por bronquiolitis por VRS y recogieron muestras de secreciones nasales durante el ingreso y un año después del alta hospitalaria. Estudiaron 27 mediadores inmunológicos en dichas muestras en ambos momentos y los mismos mediadores en 12 controles sanos. En el año de seguimiento el 85% de los pacientes ingresados por VRS presentaron al menos un episodio de sibilancias y solo el 25% en el grupo control. La mayoría de los mediadores inflamatorios encontrados elevados en secreciones nasofaríngeas volvieron a la normalidad al año de seguimiento, sin embargo en el grupo de casos los niños mostraron una hipersecreción nasal de IL10, IL6, IL17 , IL13 y otros mediadores inmunes <sup>99 100</sup>. En estudios previos la IL10 se había relacionado con la patogenia del asma postbronquiolitis, mientras que las IL13 y 7 se encontraban elevadas en pacientes asmáticos. El estudio de Pino demuestra la elevación persistente de mediadores inflamatorios en

secreciones respiratorias hasta 1 año después del ingreso por bronquiolitis por VRS y los autores sugieren ya entonces su posible relación en la patogénesis de las sibilancias persistentes postbronquiolitis<sup>99 100</sup>.

En esta tesis, se ha planteado un estudio similar en lo que se refiere a su carácter temporal y evolutivo, con el fin de describir el perfil de citoquinas presentes en sangre y en secreciones respiratorias en una cohorte de lactantes ingresados por bronquiolitis por VRS en el momento basal al ingreso, al mes y al año del alta hospitalaria. Lo que lo diferencia es que estos mediadores inflamatorios no solo se detectan en secreciones respiratorias sino también en plasma y en la fase de convalecencia se realizan dos determinaciones, al mes y al año. Además se realiza seguimiento durante 12 meses, se establecen dos subgrupos de pacientes, aquellos que desarrollan sibilancias persistentes (3 o más episodios de sibilancias ) y aquellos que no. Se comparan los perfiles de citoquinas entre ambos subgrupos de pacientes y se establecen diferencias en distintos momentos de la evolución. Así, se describe que ILs en el momento agudo y al mes pueden ayudarnos a predecir los pacientes que van a desarrollar asma postbronquiolitis y los que no, y se demuestra además que los cambios inmunológicos descritos en sangre al mes del alta se mantienen hasta un año después. Todo esto sugiere que entre el momento agudo y la convalecencia al mes comienzan a ocurrir cambios inmunes en el grupo de niños que desarrollarán sibilancias recurrentes que se detectan ya al mes de evolución, algunos de los cuales se mantienen a lo largo del tiempo. Concretamente, se midieron 10 citoquinas en plasma: IFN, TNF, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17, e IL1B y en el momento agudo de la infección la liberación de citoquinas no difiere de forma significativa entre los subgrupos de lactantes que desarrollaron sibilancias y los que no. Sin embargo, al mes de evolución, las concentraciones de TNF, IL 8, IL10, IL 17 e IL2 en el grupo de pacientes sibilantes fueron significativamente más elevados que en los pacientes que no tuvieron asma postbronquiolitis y algunas de estas diferencias se mantienen incluso 12 meses tras el ingreso hospitalario.

En esta tesis, demostramos que al año de seguimiento el IFN, la IL10 y la IL17 están significativamente más elevadas en los niños que desarrollaron sibilancias recurrentes.

Estos hallazgos sugieren que las alteraciones inmunes que induce el VRS ocurren en algún momento entre el ingreso hospitalario y el mes de evolución y se mantienen alteradas tanto tiempo como hasta 12 meses tras la infección aguda, lo que da una idea de la importancia y gravedad de estas alteraciones inmunes. Lógicamente cabe pensar que existan otros factores que puedan también explicar la elevación de estas citoquinas 12 meses después de la infección por VRS, como son la edad, el desarrollo y maduración de la respuesta inmune durante el periodo de lactante de los pacientes, si bien esto ocurrirá en ambos grupos tanto en los que tuvieron sibilancias recurrentes como en los que no y las diferencias son significativas estadísticamente incluso al año de evolución. Para saber si estas diferencias son predictores independientes de sibilancias recurrentes lo ideal sería realizar un análisis multivariante que no se ha realizado en este caso debido a que la muestra es relativamente pequeña lo que condicionaría los resultados. Aún así, nuestros resultados son muy provocadores. Pero no solamente hemos demostrado que el perfil de citoquinas de los lactantes que desarrollan sibilancias recurrentes es diferente al perfil de citoquinas encontradas en los lactantes que no desarrollan sibilancias recurrentes sino que además hemos descrito correlaciones entre ciertas citoquinas y el número de episodios de sibilancias que van a desarrollar cada paciente. Así por ejemplo, cuanto mayores son las concentraciones de TNF en plasma al mes de evolución, mayor es el número de episodios de sibilancias recurrentes en un año de seguimiento con una  $r=0,468$  y  $p=0,007$ , y además concentraciones mas elevadas de IL17 en la muestra de plasma al mes de seguimiento, se correlacionan con un mayor número de episodios de sibilancias con una  $r=0,413$  y  $p=0,019$ . Estos hallazgos, de confirmarse, nos permitirían iniciar tratamiento profiláctico con budesonida o montelukast incluso antes de alcanzar el tercer episodio de sibilancias recurrentes postbronquiolitis.

Cuando analizamos el perfil de citoquinas en secreciones respiratorias en el momento agudo y su relación con el desarrollo de asma postbronquiolitis no encontramos diferencias entre ambos grupos de lactantes, aquellos que desarrollaron sibilancias persistentes y aquellos que no. Solamente se han analizado los perfiles de citoquinas en secreciones respiratorias en el momento del ingreso y no en las fases de convalecencia.

Es la primera vez, hasta donde sabemos, que se describe en la literatura la respuesta inmune del huésped frente al VRS en plasma, de forma evolutiva a lo largo de un año y se relaciona con la evolución de la enfermedad.

#### **6.10.- INTERACCIÓN VIRUS-HUÉSPED. LA RESPUESTA INMUNE TH1 Y TH2**

Clásicamente se considera que la respuesta inmune tras una infección vírica por lo general es una respuesta Th1, mientras que la infección grave por VRS cuando los pacientes presentan sibilancias recurrentes post bronquiolitis, se asocia a un fenotipo predominantemente Th2.

Castro y cols sin embargo no encuentran en su estudio sobre 206 lactantes previamente sanos que aquellos que desarrollan sibilancias recurrentes tengan una respuesta inmunológica predominantemente Th2 <sup>114</sup>. En este artículo lo más interesante es que se analizan las respuestas inmunes de células T en el momento agudo, a los 2, 4 y 6 años de edad, el 48% desarrollaron asma, como en nuestra serie y en los que desarrollan asma encuentran niveles más bajos de IL13 a los 6 años de edad <sup>114</sup>.

En esta tesis, cuando analizamos la respuesta inflamatoria agrupando las citoquinas en respuestas Th1, Th2 y Th17 tanto en el momento agudo del ingreso, al mes y al año de evolución encontramos que:

Diferencias en las respuestas Th1 y Th2 entre los casos y controles

- En el momento del ingreso en plasma existe una mayor concentración de IFN gamma en los casos comparados con los controles, es decir, parece que ocurre una activación de la respuesta Th1 puesto que IFN gamma pertenece al grupo de mediadores inmunes de la respuesta Th1, y sugiriendo que el IFN gamma inicia la respuesta inmunológica frente a VRS, sin embargo ni TNF ni IL2 en nuestra serie están significativamente elevadas respecto a los controles. Las IL de las respuestas Th2 y Th 17 en este momento del ingreso permanecen en concentraciones similares tanto en los casos como en los controles.

- En la fase de convalecencia al mes de evolución, encontramos que tanto el IFN gamma como el TNF están más elevados en los casos que en los controles sanos, es decir persiste y se incrementa la activación Th1, a la vez comienza la respuesta Th17 con elevación de IL 17 en los casos enfermos respecto a los controles sanos y de la respuesta Th2 puesto que aparece elevada la IL6 en los casos enfermos.

En los lactantes infectados por VRS se produce una elevación de las IL de la respuesta Th1 en la fase aguda de la infección, mientras que las citoquinas de las respuestas Th2 y 17 permanecen en valores similares a los controles. Al mes de evolución las IL de la respuesta Th1 no solo permanecen elevadas sino que se incrementan las diferencias, iniciándose además, la respuestas inmunes Th2 y 17 frente al VRS. Doce meses después, la respuesta inmune Th1 permanece activa. Es, en este sentido, el Interferón gamma la citoquina más importante, que se eleva desde las fases iniciales de la infección por VRS y se mantiene elevada hasta un año después del ingreso hospitalario, hallazgo que no hemos encontrado descrito previamente en la literatura.



### Diferencias entre las respuestas Th1 y Th2 y la edad de los lactantes

Si analizamos el equilibrio Th1/Th2/Th17 según la edad de los pacientes encontramos que:

En los lactantes menores de 45 días de edad, hay una respuesta menor de IFN es decir una inhibición de la respuesta Th1 frente a VRS comparándola con los mayores de 45 días. El resto de las IL tanto de la respuesta Th1 como de las respuestas Th2 y 17 no difieren en plasma en el momento basal entre los mayores y menores de 45 días. Este hallazgo sugiere una menor respuesta Th1 en los lactantes menores de 1,5 meses y queda por aclarar si esta inhibición Th1 podría tener implicaciones en la gravedad de la bronquiolitis en los lactantes mas pequeños.

En las fases de convalecencia solamente encontramos que el TNF al año de evolución es mas elevado en menores de 45 días lo que sugiere que la respuesta Th2 predomina en los lactantes mas pequeños cuando se enfrentan al VRS pero solamente en fases tardías de la infección.

En el análisis de secreciones respiratorias en el momento agudo encontramos diferencias en cuanto a TNF, IL1 e IL 10 entre los mayores y menores de 45 días.

En resumen, los lactantes mas pequeños tienen menor respuesta inmune Th1 en plasma en el momento basal, menor respuesta Th1 y también Th2/Th10 en secreciones respiratorias lo que sugiere que la gravedad de la bronquiolitis en los lactantes menores de 45 días podría explicarse por una menor respuesta inmune tanto Th1 y Th10 en este subgrupo de edad, hallazgos coincidentes con la literatura.

### Diferencias entre las respuestas Th1 y Th2 y el desarrollo de asma postbronquiolitis

Para establecer si existe una relación entre los patrones Th1/Th2/Th17 y el desarrollo de asma postbronquiolitis encontramos que en el momento basal no existe en nuestro estudio, predominio de ninguna de las respuestas Th1, 2 y

17, pero al mes de evolución aquellos que desarrollan sibilancias tienen más elevadas la mayoría de las IL Th1 ( IFN, TNF e IL2), pero no las IL2 analizadas (IL4 y 6). Sin embargo sí existe una elevación de IL10 y en este mismo sentido encontramos elevación de Th17 (IL17) en los lactantes que van a desarrollar asma postbronquiolitis. Es decir que al mes de evolución los lactantes que van a desarrollar sibilantes recurrentes presentan activación sobre todo de la respuesta Th1 pero también de la respuesta Th17 y Th 10 en contra de lo que especulan algunos autores que sugieren que una activación Th2 predominante es lo que explicaría el asma postbronquiolitis. Destaca además, una elevación significativa de las concentraciones de IL 8 en el grupo de lactantes con sibilantes recurrentes, se trata de una IL inflamatoria con las implicaciones que puede tener en el desarrollo de asma postbronquiolitis. La discordancia con la literatura depende de si consideramos a la IL 10 como una citoquina de la respuesta Th10 o de la respuesta Th2 como hacen algunos artículos clásicos, pero en artículos recientes también se especula con que son las otras IL de la respuesta Th2 (IL 4 y 6) las que explicarían el desarrollo de sibilancias recurrentes, hallazgo que en ningún momento hemos encontrado en nuestro trabajo de investigación.

En las muestras de la convalecencia al año de evolución persiste la activación Th1 (IFN, aunque se pierde la diferencia en lo referente a TNF e IL2), y asimismo persiste también la elevación de la respuesta Th17.

En resumen, en los lactantes que desarrollan sibilantes recurrentes, en el momento agudo de la infección existe una respuesta Th1 predominante en plasma, y en las fases de convalecencia al mes y al año existe activación de IL de las respuestas Th1,10 y 17 que se mantiene hasta 12 meses después de la infección aguda. Por tanto no se confirma una de las hipótesis mas extendidas sobre el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis, según la cual seria la selección de una respuesta predominante Th2 lo que condicionaría el desarrollo de asma postbronquiolitis.

En esta tesis encontramos que son las respuestas Th1, Th17 y también Th10 , pero no Th2, las mas involucradas en la patogénesis de las sibilancias recurrentes tras la bronquiolitis por VRS.

#### **6.11.- DISCREPANCIA ENTRE LA PRODUCCION DE CITOQUINAS EN SANGRE PERIFERICA Y EN SECRECIONES NASALES EN LACTANTES CON BRONQUIOLITIS**

Se ha especulado bastante en la literatura sobre si la producción de citoquinas en plasma o sangre periférica refleja o no la respuesta inmune en la vía aérea de los lactantes con bronquiolitis por VRS u otros virus. Pitrez y colaboradores<sup>206</sup> en 2004 estudiaron si las concentraciones de IL4 , IFN e IL 10 en sangre periférica se asociaban o no con la liberación de citoquinas en la vía aérea en 20 lactantes con bronquiolitis con una edad media de 3,5 meses. Encontraron una correlación significativa entre los niveles de IL4 en lavado nasal y sangre periférica ( $r=0,5$  y  $p=0,02$ ) pero no encontraron asociación alguna entre IFN e IL 10 en ambas localizaciones. Estos hallazgos se comprobaron tanto en los pacientes en los que la bronquiolitis fue debida a VRS y en aquellos en los que fueron otros los virus involucrados. Este estudio sugiere que probablemente no existe una correlación entre la liberación de citoquinas en ambas localizaciones. Tampoco esta claro si la respuesta inmune en las vías aéreas refleja o no la inflamación en pulmón.

Otros autores como Ingram<sup>207</sup> demostraron que los niveles de proteína catiónica eosinofílica en vías aéreas en niños con sibilancias recurrentes son 20 veces mas elevados que en sangre periférica por lo que se hipotetiza con la posibilidad de que la evaluación de la respuesta inflamatoria en sangre podría infraestimar lo que de verdad ocurre en vía aérea.

En nuestro trabajo hemos buscado alguna relación en el momento agudo de la infección por VRS entre las concentraciones de citoquinas en plasma y en secreciones respiratorias. Hemos analizados el panel completo de citoquinas en ambas localizaciones y así globalmente no hemos encontrado concordancia completa en los patrones de liberación de citoquinas.

Sin embargo en un análisis mas detallado, se observa como existe una correlación negativa entre los niveles de IL 6 en sangre y secreciones respiratorias, es decir una relación inversa entre las concentraciones de este mediador inmunológico en ambos sitios analizados, de forma que cuanto mayores son los niveles en plasma menores lo son en el lavado nasal y viceversa. Se ha encontrado también una asociación, en este caso positiva, entre los niveles de IL10 en plasma y lavados nasales, de forma que cuanto mayores son las concentraciones de IL10 en sangre mayores son en secreciones respiratorias. Es la única asociación relevante encontrada en nuestro trabajo, aunque pudiera ser muy interesante por las implicaciones previamente descritas de la IL10 en el desarrollo de asma postbronquiolitis. Si esta asociación en cuanto a la IL 10 plasma/secreciones respiratorias se confirma haría mucho mas fácil la determinación de esta citoquina sin tener que recurrir a extracciones sanguíneas para predecir el curso evolutivo de la enfermedad y la determinación precoz de IL10 en secreciones respiratorias en el momento agudo se podría convertir en un marcador precoz de sibilancias recurrentes, identificando a aquellos lactantes que van a desarrollar hiperreactividad bronquial tras una bronquiolitis.

Cuando se analizan globalmente, las correlaciones de las IL en sangre y en secreciones respiratorias llama la atención como la IL 10 en secreciones respiratorias se correlaciona positivamente no solo con los niveles de IL 10 en plasma como ya hemos descrito sino también con las concentraciones de otras citoquinas en plasma basal como son: IFN, IL2, IL4, IL6 e IL 17. El significado de estas correlaciones se desconoce, no sabemos si la IL10 en secreciones respiratorias podría permitirnos inferir los niveles de estos otros mediadores inflamatorios en sangre. No hemos encontrado otras aportaciones similares en la literatura.

No obstante, parece que el grado de correlación entre los mediadores inflamatorios en la vía aérea y en sangre periférica es bajo y aunque en nuestro trabajo hemos encontrado algunas concordancias desconocemos su significado y creemos que es necesario profundizar mas en este tema.

#### **6.12.- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL TNF PLASMATICO AL MES DE EVOLUCION EN LA BRONQUIOLITIS POR VRS Y SU VALOR PREDICTIVO EN LAS SIBILANCIAS RECURRENTES.**

Las concentraciones de TNF en plasma en la fase de convalecencia precoz se correlacionan con el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis. A pesar de que el área bajo la curva ROC construida es bastante aceptable con un área de 0,8, sin embargo, para un valor de 12,8 picogramos/ml la Sensibilidad es bastante baja ( $S=0,6$ ), pero con una buena Especificidad 94%. Aisladamente este valor de TNF no nos permite identificar precozmente a los lactantes que van a presentar sibilancias recurrentes. Cuando se combinan los valores de dos citoquinas plasmáticas al mes como son el propio TNF mas la IL 17 obtenemos una curva ROC muy similar con valores de sensibilidad y especificidad muy parecidos a los obtenidos solamente con los valores de TNF. Si construimos una curva ROC con los niveles de TNF alfa al mes de evolución y para la IL17 plasmática al mes de evolución y el numero de episodios de sibilancias recurrentes el área obtenida en ambos casos es del 0,96, herramienta que nos puede permitir predecir que pacientes van a tener sibilancias recurrentes y aun mas, cuantos episodios tendrán en el periodo de un año de estudio.

Asimismo hemos construido curvas ROC para la IL8 en secreciones respiratorias y el score de gravedad y los días en los que los pacientes necesitan oxigeno y el área obtenida para ambas curvas es 0,96, un valor muy alto y que nos permitirá predecir la gravedad de la bronquiolitis VRS.

Estos hallazgos nos sugieren que las citoquinas tanto en plasma como en secreciones respiratorias se pueden convertir en marcadores de gravedad y evolución de la enfermedad por VRS aunque no se debe olvidar que necesariamente existen más factores aparte de los inmunológicos que pueden condicionar también el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis.

## *Capítulo 7. Conclusiones*





## **7.1.- CONCLUSIONES**

Del trabajo realizado y expuesto previamente se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1.- El 46% de los pacientes ingresados por bronquiolitis por VRS desarrollan sibilancias recurrentes postbronquiolitis, y tan solo el 10% de los controles sanos, en los 12 meses de seguimiento.

2.- El 79% de los pacientes de esta cohorte están infectados por VRS A y el 21% por VRS B. Los pacientes infectados por VRS A desarrollan sibilancias recurrentes con mayor frecuencia que aquellos en los que la bronquiolitis es debida al VRS B.

3.- No existen diferencias significativas en las concentraciones de citoquinas en plasma o secreciones respiratorias en el momento basal, entre los lactantes infectados por VRS A y los infectados por VRS B.

4.- Existen diferencias en las concentraciones de mediadores inmunes en plasma en el momento basal, entre los casos ingresados por bronquiolitis por VRS y los controles sanos, especialmente en las concentraciones de IFN.

Así, en los lactantes infectados por VRS se produce una elevación de las IL de la respuesta Th1 (IFN) en la fase aguda de la infección, mientras que las citoquinas de las respuestas Th2 y 17 permanecen en valores similares a los controles sanos.

5- Los lactantes menores de 45 días de edad, ingresados por bronquiolitis debida a VRS, presentan en el momento del ingreso en plasma concentraciones menores de IFN que los lactantes mayores, y en secreciones respiratorias se encuentran concentraciones menores de TNF, IL 10 e IL 1B incluso hasta los 3 meses de edad; es decir la respuesta inmunológica en

sangre y secreciones respiratorias, en los lactantes más pequeños es diferente que en el resto de los enfermos, lo que puede explicar la mayor gravedad de la enfermedad en estos lactantes más pequeños.

En lo referente al género describimos que los varones liberan mayor cantidad de IFN gamma en plasma, en el momento basal que las mujeres.

6.- Cuando analizamos los niveles de citoquinas en plasma o secreciones respiratorias y la gravedad de la enfermedad concluimos que:

- Las concentraciones de IL8 en plasma en el momento agudo, en las primeras horas del ingreso hospitalario, permiten predecir la estancia media de los pacientes, y de alguna manera la gravedad, con las implicaciones de manejo terapéutico y de monitorización y vigilancia para este subgrupo de pacientes.

- Encontramos también una correlación positiva entre los niveles de IL8 en secreciones respiratorias en el momento del ingreso y la puntuación del score de gravedad, quizás este marcador inflamatorio en las secreciones nos permita prever la gravedad de la bronquiolitis por VRS. La curva ROC de predicción de gravedad para IL8 en secreciones respiratorias es de 0,98.

7.- En lo que se refiere a la relación entre la producción de citoquinas y el desarrollo de sibilancias recurrentes durante el período de estudio encontramos que:

- En el momento agudo de la infección, la liberación de citoquinas tanto en plasma como en secreciones respiratorias, no difiere de forma significativa entre los subgrupos de lactantes que desarrollan sibilancias recurrentes y los que no, en ambos hay una respuesta Th1 predominante.

- En la fase de convalecencia precoz, al mes del alta hospitalaria, las concentraciones plasmáticas de TNF, IL2, IL8, IL10 e IL 17 son más elevadas en los lactantes que desarrollan sibilancias post bronquiolitis que en aquellos lactantes que no lo hacen. Estas citoquinas se pueden utilizar como marcadores precoces de la evolución de la enfermedad.

-A los 12 meses de evolución, en plasma las concentraciones de IFN, IL10 e IL17 permanecen más elevadas en los lactantes que desarrollan sibilantes recurrentes tras la infección inicial.

-Algunas IL como TNF e IL 17 en plasma, en la muestra de la convalecencia precoz, al mes de evolución, permiten predecir no solo si el lactante desarrollará o no sibilantes recurrentes, sino también el número de episodios de sibilancias que tendrá el paciente. Estos hallazgos nos permitirían iniciar tratamiento profiláctico con budesonida o montelukast incluso antes de alcanzar el tercer episodio de sibilancias recurrentes postbronquiolitis.

8.- La correlación entre las concentraciones de citoquinas en plasma y en secreciones respiratorias, estudiadas en el momento agudo es débil en general, aunque encontramos correlación negativa entre los niveles de IL6 en sangre y secreciones respiratorias y correlación positiva en cuanto a IL 10 en ambas localizaciones.

9.- Se ha descrito una relación entre las concentraciones de IFN gamma e IL 8 en plasma en la fase aguda de la infección y el número de neutrófilos, traduciendo una importante inflamación sistémica durante la fase aguda de esta enfermedad.

10.- Este trabajo nos ha permitido conocer mejor la respuesta inmune de los lactantes frente al VRS, tanto en el momento basal, como en las fases de convalecencia, incluso hasta 12 meses después del alta hospitalaria. Esta información nos ayudará a predecir la gravedad de la bronquiolitis por VRS durante el ingreso hospitalario de los pacientes, así como su evolución y saber que lactantes van a desarrollar sibilantes recurrentes post bronquiolitis para instaurar precozmente las medidas profilácticas y terapéuticas oportunas, lo que nos permitirá optimizar el manejo clínico de estos pacientes.



## *Capítulo 8. Aplicaciones prácticas*



### **8.1.-APLICACIONES PRÁCTICAS DE ESTA TESIS.**

1.- El conocimiento de la relación entre los subtipos A y B del VRS y el desarrollo de sibilancias recurrentes postbronquiolitis, nos permitirá si somos capaces de definir precozmente en cada epidemia cual es el subtipo circulante predominante conocer el riesgo de los lactantes de desarrollar asma en esa epidemia concreta.

2.- Las concentraciones de IL8 en plasma en las primeras horas del ingreso hospitalario, permiten predecir la estancia media de los pacientes, con las implicaciones de manejo terapéutico y de monitorización y vigilancia para este subgrupo de pacientes. Además la medición de las concentraciones de IL 8 en secreciones respiratorias en el momento del ingreso, se correlaciona con el score de gravedad de la enfermedad, por lo que podría ser un marcador precoz de gravedad.

3.- La determinación de las concentraciones en plasma al mes de evolución de TNF, IL2, IL8, IL10 e IL17 permitirá predecir que lactantes presentan riesgo de desarrollar sibilancias recurrentes e instaurar las medidas profilácticas y/o terapéuticas mas adecuadas con el fin de intentar cambiar el curso evolutivo de la enfermedad.

4.- Las concentraciones de IL17 y TNF al mes del ingreso no solo permiten discernir que pacientes desarrollaran asma postbronquiolitis y cuales no, sino también predecir cuantos episodios de sibilancias presentaran, por lo que se podría instaurar profilaxis incluso antes de alcanzar los tres episodios de sibilancias que actualmente se establecen como limite para el inicio del tratamiento preventivo.

5.- El mejor conocimiento de la respuesta inmune frente al VRS puede permitir avanzar en el desarrollo de vacunas frente a esta enfermedad, actualmente en desarrollo, de las que se beneficiarían tanto los lactantes con bronquiolitis en la fase aguda como también aquellos que desarrollan hiperreactividad bronquial, evitándose así el desarrollo de asma postbronquiolitis.





## *Capítulo 9. Anexos*





CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 2 -

## HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

La bronquiolitis es una infección vírica de la vía aérea, que afecta a niños menores de 2 años de edad y que produce fiebre, dificultad respiratoria, rechazo del alimento... En la mayoría de los casos el niño se trata en su domicilio, si bien en ciertas ocasiones el paciente precisa ingreso y tratamiento hospitalario.

Aproximadamente el 30% de los niños que presentan una bronquiolitis en los primeros meses de vida tienen episodios recurrentes de dificultad respiratoria durante el primer año. Estos episodios recurrentes de dificultad respiratoria precisan tratamiento, y en ocasiones ingreso hospitalario. No se sabe muy bien por qué algunos niños tras un primer episodio de bronquiolitis se curan y no presenta recurrencias y otros sí: quizás depende del virus que causa la infección, de la respuesta individual de cada paciente frente a la infección, o de los antecedentes familiares de alergia o asma... Para dar respuesta a esta y otras cuestiones, se necesita analizar secreciones respiratorias y muestras sanguíneas, tanto de lactantes que ingresan en nuestro hospital diagnosticados de bronquiolitis, como de niños sanos para poder comparar su material biológico con el de los lactantes enfermos.

En relación con la cohorte de enfermedades respiratorias (bronquiolitis), que se localiza en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid) y que el/la Dr/Dra..... le ha presentado, se le solicita su consentimiento para que su hijo o tutelado pueda participar colaborando con sus muestras de sangre y secreciones respiratorias y con la información clínica relevante asociada a las mismas.

Si decide dar su consentimiento, a su hijo o tutelado se le extraerán 2 ml de sangre y secreciones respiratorias para el almacenamiento de sus productos derivados (sangre, plasma, ADN y secreción respiratoria) en el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Este biobanco, dirigido por la Dra. M. Ángeles Muñoz Fernández y coordinado por Isabel García Merino, está situado en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid) y se dedica a la recepción, el procesamiento y el



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 3 -

almacenamiento de muestras biológicas de diversa índole procedentes de distintos servicios del hospital. Posteriormente las muestras almacenadas se entregarán, bajo acuerdos de cesión, a proyectos de investigación relacionados con la bronquiolitis, previamente aprobados por el Comité de Ética y por el Comité Científico del BioBanco. De este modo, el material biológico de su hijo o tutelado permanecerá en el BioBanco hasta que se entregue para dichos proyectos.

De las células de su hijo o tutelado se extraerá el ADN, cuyo análisis permite determinar las características físicas personales, de modo que a partir de él se puede obtener información acerca de su salud.

La toma de muestras de sangre se llevará a cabo en este hospital, y siempre coincidiendo con otras revisiones clínicas, de forma similar a otros análisis que hayan hecho a su hijo o tutelado. Como probablemente conoce, la extracción de sangre puede provocar una molestia en el punto en que se introduce la aguja en la piel, y a veces puede ocasionar un pequeño hematoma que suele desaparecer en pocos días. Ocasionalmente, puede producir mareo. En el caso de los niños sanos, coincidiendo con otra analítica que se vaya a hacer al menor, se sacará un poco más de sangre para esta cohorte. Para los lactantes con bronquiolitis se extraerá una muestra de sangre al ingreso o en las primeras 48 horas, otra al primer mes del alta y otras dos, una a los 6 y otra a los 12 meses de vida del niño.

La toma de muestras de secreciones respiratorias se llevará a cabo en este hospital y para ello se aspiran las secreciones respiratorias del menor, previo lavado nasal con suero salino fisiológico. Esta práctica puede ocasionar un atragantamiento leve y/o un ligero sangrado nasal. En el caso de los niños sanos, esta extracción se realizará en un control rutinario. Para los lactantes con bronquiolitis se realizará al ingreso o en las primeras 48 horas.

Por otra parte, y en relación con la información clínica, si usted decide que su hijo o tutelado participe en esta cohorte los datos clínicos derivados de su seguimiento habitual, así como algunos reflejados en su historia clínica y sus antecedentes familiares



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 4 -

se almacenarán de forma indefinida en el Servicio de Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. La coordinadora de esta cohorte es la Dra. Rosa Rodríguez Fernández. Estos datos serán almacenados y analizados conjuntamente con los del resto de pacientes y donantes incluidos en esta cohorte, y posteriormente se podrán ceder a proyectos de investigación.

Las muestras biológicas almacenadas en el BioBanco y sus datos asociados podrán utilizarse para cualquier investigación biomédica en los términos que prescribe la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y se custodiarán y cederán a terceros, con fines de investigación, según lo establecido en esta norma y en el resto de la legislación nacional vigente referida a esta materia. Estos datos y muestras servirán para realizar estudios de investigación relacionados con la bronquiolitis.

Se le pide su consentimiento para que con la sangre, las secreciones respiratorias y la información clínica de su hijo o tutelado se realice:

1. Un almacenamiento de muestras (sangre, plasma, ADN y secreción respiratoria) y de datos clínicos por un tiempo indefinido.
2. Análisis y estudios en dichas muestras y datos, entre ellos los análisis de ADN, también llamados de carácter genético.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que ni usted ni su hijo o tutelado obtendrán ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarles por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, ustedes renuncian a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderles en el futuro y que sea, lógicamente, renunciabile. Tampoco obtendrán ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en esta cohorte. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de las muestras y datos de su hijo o tutelado y de las de muchas otras personas participantes en esta cohorte, supondrán una fuente valiosa de información que revertirá en un mejor conocimiento de esta enfermedad, con el consiguiente avance médico y la mejora del cuidado de los pacientes afectados por esta patología.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 5 -

Los datos obtenidos de las muestras no le serán comunicados ni a usted ni al médico de su hijo o tutelado, excepto en el caso de que los hallazgos tengan una implicación significativa en la salud de su hijo o tutelado y exista una posibilidad real de mejora. En este caso tendrá derecho a conocer todo tipo de datos, incluidos los genéticos, que se obtengan a partir de sus muestras. Los resultados serán analizados por grupos de investigadores y expertos. A partir de los datos obtenidos de las muestras de su hijo o tutelado se puede obtener información sobre su salud y la de sus familiares y usted tiene derecho a decidir sobre la comunicación de estos resultados y, si usted lo desea, ejercitar su potestad de no ser informado.

Su participación es voluntaria y usted es libre de solicitar la retirada de las muestras de su hijo o tutelado del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón y/o de ejercitar derechos de acceso, rectificación o cancelación de sus datos clínicos, almacenados en el Servicio de Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, siempre y cuando éstos no hayan sido anonimizados y por tanto sean imposibles de identificar o se hayan incorporado a proyectos de investigación ya iniciados. Tanto la solicitud de retirada de las muestras de su hijo o tutelado, como la de acceso, rectificación o cancelación de sus datos asociados, puede llevarse a cabo por cualquier motivo, sin tener que dar ninguna explicación y sin que repercuta negativamente sobre el tratamiento futuro de su hijo o tutelado. Su hijo o tutelado tendrá derecho a acceder a la información sobre sus muestras y datos asociados cuando alcance la mayoría de edad. Para solicitar la retirada de las muestras y/o la destrucción o rectificación de los datos clínicos comunique esta decisión a su médico y solicítele que lo ponga en conocimiento del BioBanco y de la coordinadora de la cohorte de enfermedades respiratorias (bronquiolitis). También puede ponerse directamente en contacto con el BioBanco y con la Dra. Rosa Rodríguez Fernández en las direcciones de correo electrónico: [BioBancoVIH.baugm@gmail.com](mailto:BioBancoVIH.baugm@gmail.com) y

[rodriguezfhengm@salud.madrid.org](mailto:rodriguezfhengm@salud.madrid.org)

En este caso, se procedería a la destrucción de las muestras y/o a la rectificación o exclusión de la información clínica de su hijo o tutelado. Sin embargo, esta destrucción no se hará extensible a los datos de las



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 6 -

investigaciones que ya se hayan realizado previamente con las muestras de su hijo o tutelado o con su información clínica.

Los datos personales que se recojan sobre su hijo o tutelado, incluidos aquellos que se soliciten adicionalmente al hospital, conforme a la necesidad de la investigación que nos ocupa y siempre bajo su autorización, serán confidenciales y se tratarán conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y el resto de legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose únicamente de acuerdo con los objetivos descritos en el presente comunicado. Cualquier relación entre la muestra y la identidad personal de su hijo o tutelado tiene carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se le informa de que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones, sin embargo, nunca será facilitada la identidad de su hijo o tutelado o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle, manteniéndose en todo momento su confidencialidad.

En el momento en que usted consienta el uso de las muestras de su hijo o tutelado para los fines de investigación aplicada descritos, éstas serán sometidas a un proceso de disociación. Es decir, su hijo o tutelado sólo será identificado por un número y/o código, constando todos sus datos debidamente codificados, por lo que los investigadores implicados nunca conocerán su identidad o dato alguno que pudiera llegar a identificarle; sin embargo, si podrán acceder a otros datos como su sexo o edad, pero siempre manteniendo la debida confidencialidad conforme a la legislación vigente.

Los datos clínicos de su hijo o tutelado serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, cuya titularidad





CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 7 -

corresponde al Hospital General Universitario Gregorio Marañón, con la finalidad de gestionar la cohorte descrita en el presente consentimiento.

Si usted lo desea, y previa petición expresa, el BioBanco le informará sobre los estudios que se están llevando a cabo con las muestras y datos clínicos de su hijo o tutelado.

Si en un futuro cesan las actividades del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón, informaremos al médico de su hijo o tutelado para que contacte con usted y ponga en su conocimiento esta circunstancia. En este caso, la información sobre el destino de las muestras de su hijo o tutelado estará a su disposición y a la del resto de los participantes en el Registro Nacional de Biobancos, para que puedan manifestar su conformidad con el destino previsto para las muestras.

Esta *Hoja de Información y Consentimiento Informado* se expedirá en tres ejemplares firmados: uno para usted, otro para el médico de su hijo o tutelado que lo guardará en su historia clínica y un tercero para entregar al BioBanco.

Se contempla la posibilidad de que personal acreditado por las Autoridades Sanitarias Españolas y/o representantes del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital puedan realizar una auditoría de las muestras y datos pertenecientes a pacientes participantes en esta cohorte para comprobar que su recopilación se está llevando a cabo de forma correcta desde el punto de vista ético y científico, siempre dentro de la más estricta confidencialidad.

No dude en recabar más información o en hablar con el médico de su hijo o tutelado para aclarar cualquier duda, tanto al inicio del estudio como en cualquier momento a lo largo del mismo.





CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 8 -

**CONSENTIMIENTO POR ESCRITO**

OBTENCIÓN DE SANGRE Y SECRECIONES RESPIRATORIAS PARA SU  
PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO EN EL BIOBANCO DEL HOSPITAL  
GREGORIO MARAÑÓN, OBTENCIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y ANALÍTICOS  
PARA SU REGISTRO EN EL SERVICIO DE PEDIATRÍA DEL HOSPITAL  
GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN Y CESIÓN DE  
MUESTRAS Y DATOS CLÍNICOS CON FINES INVESTIGADORES.

YO, .....

Declaro que:

1. He leído la Hoja de Información que me ha sido entregada.
2. He podido hacer preguntas sobre la obtención de sangre y secreciones respiratorias, su almacenamiento en el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón y el análisis de las muestras, así como sobre la cesión de datos clínicos al Servicio de Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
3. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr. ....
4. Entiendo que la participación de mi hijo o tutelado es voluntaria.
5. Comprendo que puedo solicitar la destrucción de las muestras de mi hijo o tutelado y/o de su información clínica en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos futuros.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 9 -

Por favor, firme donde proceda:

- Doy mi consentimiento para que se realice a mi hijo o tutelado la extracción de sangre y de secreciones respiratorias y el almacenamiento de sus componentes en el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón.

Fecha:                      Nombre del hijo o tutelado:                      Nombre y firma del padre o tutor:

- Doy mi consentimiento para la cesión de las muestras y datos clínicos de mi hijo o tutelado y lo estipulado en esta Hoja de Información.

Fecha:                      Nombre del hijo o tutelado:                      Nombre y firma del padre o tutor:

Si usted desea incluir alguna restricción sobre el uso de las muestras y datos clínicos de su hijo o tutelado, indíquelo a continuación.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA COHORTE DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

(BRONQUIOLITIS)

BB F3g/Rev01/Febrero 2012

- 10 -

- Quiero ejercer mi derecho a no ser informado de los resultados obtenidos con los estudios realizados con las muestras de mi hijo o tutelado, incluso cuando los hallazgos tengan una implicación significativa en su salud y exista una posibilidad real de mejora (firmar sólo si procede).

Fecha:                      Nombre del hijo o tutelado:                      Nombre y firma del padre o tutor:

(A firmar por el personal que informa al participante. Firma y cumplimentación obligatoria)

Fecha:                      Nombre del investigador que informa:                      Firma del investigador:



## HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

BB F4/Rev01/Febrero 2011

-1-

ESTUDIO/COHORTE		HOSPITAL	
NÚMERO DE MUESTRA		CODIGO DE PACIENTE	
INICIO TRATAMIENTO		Nº DE HISTORIA CLÍNICA	

## COMPROBACION PREVIA A LA EXTRACCION

- ☐ El paciente está convenientemente informado. Tres copias de Consentimiento Informado: primera copia se guarda en historia clínica; segunda copia se entrega al paciente; tercera copia se manda a BioBanco por e-mail
- ☐ Se ha avisado al BioBanco con antelación del día de la extracción
- ☐ Identidad del paciente comprobada y coincide con la que figura en el Consentimiento Informado

## MATERIAL NECESARIO A PREPARAR

- ☐ Material para el empaquetado de las muestras: bolsa de cierre hermético (1 por paciente), papel de filtro, contenedor secundario específico para el transporte de sustancias de categoría B, contenedor terciario (opcional).
- |         |  |
|---------|--|
| Muestra | <input type="checkbox"/> sangre<br><input type="checkbox"/> biopsia hígado donante<br><input type="checkbox"/> biopsia hígado receptor<br><input type="checkbox"/> biopsia bazo donante<br><input type="checkbox"/> aspirado nasal |
|---------|--|
- ☐ Juego de etiquetas de código de barras (1 por muestra)
- ☐ Hoja de recogida de datos cumplimentada
- ☐ Consentimiento informado cumplimentado y firmado. Se escanea y se envía al BioBanco por e-mail

## MÉTODO

- A. Sangre. Tubo EDTA-K3 (código de color morado)
- B. Biopsia hígado. Sumergir en ARN later<sup>®</sup>
- C. Biopsia bazo. Sumergir en suero salino
- D. Aspirado nasal en medio de cultivo viral

- ☐ Etiqueta de código de barras pegadas en los tubos extraídos y en hoja de recogida de datos
- ☐ Envío de hoja de recogida de datos correctamente cumplimentada
- ☐ Envío de Consentimiento Informado firmado por e-mail
- ☐ Embalaje de los tubos según procedimiento

Fecha de Extracción: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

FIRMA:

Viabilidad (rellenar por BioBanco): \_\_\_\_\_ viales de \_\_\_\_\_ millones de células

## COMENTARIOS

### 9.3.- ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO CLINICO

ADREMA O ETIQUETA IDENTIFICATIVA



Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón  
Comunidad de Madrid



SERVICIO:PEDIATRIA

#### DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre y apellidos del/  
la paciente

---

Nombre y apellidos del  
facultativo que informa:

---

Nombre del  
procedimiento:

---

Deseo ser informado sobre mi enfermedad y/o las intervenciones que se me  
van a realizar: **SI** **NO** **Marcar X**

Deseo que la información de mi enfermedad y/o intervenciones le sea  
proporcionada a:.....

Explicación sencilla del objetivo del procedimiento, en qué consiste y la forma en que se va a llevar a cabo:

La bronquiolitis es una infección vírica de la vía aérea, que afecta a niños menores de 2 años de edad y que produce síntomas durante la fase aguda: fiebre, dificultad respiratoria, rechazo del alimento, tiraje, taquipnea, sibilancias en la auscultación. En la mayoría de los casos el niño se trata en su domicilio, si bien en ciertas ocasiones el paciente precisa ingreso y tratamiento hospitalario. Pero además ocurre que aproximadamente el 30% de los niños que presentan una bronquiolitis en los primeros meses de vida tienen episodios recurrentes de dificultad respiratoria durante el primer año tras aquel primer episodio, estos episodios recurrentes de dificultad respiratoria precisan tratamiento, y en ocasiones ingreso hospitalario. No se sabe muy bien porqué algunos niños tras un primer episodio de bronquiolitis se curan y no presenta recurrencias y otros sí: quizás depende del virus que causa la infección, o de la respuesta individual de cada paciente frente a la infección, o de los antecedentes familiares de alergia o asma..... En este sentido, queremos saber de los lactantes que ingresan en nuestro hospital diagnosticados de bronquiolitis, que niños van a tener asma ( episodios recurrentes de dificultad respiratoria) y que niños no, para ello hemos diseñado un estudio en el que si usted quiere participar, necesitamos conocer la historia clínica del niño, sus antecedentes familiares y analizar sus secreciones respiratorias para medir la inflamación y una muestra de sangre durante el ingreso para conocer su respuesta específica e individual frente a la infección. Una vez dado de alta , seguiremos a estos niños durante un año para valorar su evolución clínica y valorar en dos muestras de sangre ( al mes , y a los 12 meses tras el alta) cómo ha cambiado la respuesta de cada niño. El objetivo final es llegar a saber antes de que ocurra que niños tendrán asma tras una bronquiolitis y así poder intervenir precozmente y evitarlo.

El beneficio será en un futuro poder prevenir el asma en estos niños y a corto plazo el seguimiento estricto durante un año de cada paciente

Descripción de las consecuencias seguras del procedimiento siempre que se consideren relevantes:

Descripción de los riesgos típicos:

Los propios de una extracción de sangre y secreciones respiratorias

Descripción de los riesgos que, siendo infrecuentes, pero no excepcionales, se consideran graves:

Ninguno

Contraindicaciones Dado que no se incluyen pacientes con patología de base no existen contraindicaciones

Descripción de riesgos personalizados:

Usted debe saber que existe disponibilidad absoluta por parte del médico que está informando a ampliar la información si usted así lo desea.

**Declaración del paciente:**

- He recibido información acerca de los extremos indicados en los apartados previos, así como alternativas diferentes al procedimiento si las hubiera
- Estoy satisfecho con la información recibida, he aclarado mis dudas y se que puedo revocar este consentimiento sin que precise dar ninguna razón, y sin que ello suponga un deterioro de la calidad de la asistencia recibida.

**Fecha y firma del facultativo que informa: Fecha y firma del paciente, en todos los casos.**

**Fecha, nombre y firma del representante**

**en caso de ser necesario (*paciente menor* Fecha y firma de persona en quien  
*o incapaz*) haya delegado**

**(*si renunció a la información y delegó  
en familiar o allegado*)**

**En caso de revocación del consentimiento, fecha y firma:**



#### 9.4.- ANEXO 4. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS INICIAL PACIENTE

##### RSV Survey

**Name:**

**Medical Record:**

**Age:**

**DOB:**

Admission	Discharge	1 month	6 months	1 year	2 years

##### Symptoms at admission

Fever:

Cough:

Coryza:

Tachypnea:

Grunt:

Chest Retraction:

Cyanosis:

Central pauses:

Wheezing:

Crackles:

Rales:

Others:

**Diagnosis at admission:**

**Diagnosis at discharge:**

**Discharge date:**

**Numbers of days:**

##### **Chest X Ray:**

Hyperinsuflation

Infiltrate

Condensation

Both

Atelectasis

**CBC:**

Leukocytes:

% Linf

% Eos

absolute eosinophil count:

	Yes	No	Maximum value	Nº days
Systemic steroids				
Oxygen				
Antibiotics				
Hemodynamic support				
Mechanical ventilation				
Non-invasive				
Invasive				
PICU				
Viral coinfection				
Bacterial coinfection				

**Diagnosis method** (DFA, culture, PCR, etc):

**Physical examination**

Symptoms of atopy:

Facial erythema:

Denny's lines:

Hyperkeratosis:

Dry skin:

Dermographism:

HEENT:

CV:

Lungs:

Abd:

Extrem:

**Prior medical history:**

## Personal

Wheezing		Sinusitis		Breastfeeding	
Pneumonia		GER		N° months	
Rhinitis		Maternal smoke		Preterm? (N° weeks)	
Dermatitis		Smoke in house		Day care	
Otitis		Pets		Wheezing episodes	
Steroids (po, inh)		Overcrowding (n= )		What age?	
N° offspring (ages):					
Medications:					
Prior confirmed viral respiratory disease:					
Other diseases:					

## Familiar

		Who?
Asthma		
Atopic Rhinitis		
Atopic Dermatitis		

## 9.5.- ANEXO 5. HOJA DE SEGUIMIENTO PACIENTES

### HOJA DE SEGUIMIENTO VRS

NOMBRE

NÚMERO DE HISTORIA

NÚMERO DE RECLUTAMIENTO

EDAD EN EL MOMENTO DE LA REVISIÓN

FECHA DE LA REVISIÓN:

BRONQUIOLITIS VRS +/-

REVISIÓN ( RODEAR LO QUE PROCEDA): 1M, 3M, 6M, 9M, 12M

### **ANTECEDENTES PERSONALES:**

- EMBARAZO:
- PARTO
- NEONATAL INMEDIATO
- PREMATURIDAD (EG):
- PALIVIZUMAB: SI / NO
- DERMATITIS ATÓPICA/ SEBORREICA : SI/ NO
- PROCESOS RESPIRATORIOS PREVIOS: SI / NO ( ESPECIFICAR)
- ALERGIA A ALIMENTOS ( ESPECIFICAR) . SI/ NO
- ALERGIA A ANTIBIÓTICOS ( ESPECIFICAR): SI/ NO
- ESCOLARIZADO: SI/ NO. EDAD DE ESCOLARIZACIÓN

## **ANTECEDENTES FAMILIARES**

- MADRE:
  - . ASMA. SI/ NO
  - . DERMATITIS ATÓPICA: SI/ NO
  - . ALERGIA A ALIMENTOS: SI/ NO
  - . ALERGIA A AB: SI/ NO
  - . OTRAS ALERGIAS ( ESPECIFICAR).
  - . FUMADORA
  
- PADRE:
  - . ASMA. SI/ NO
  - . DERMATITIS ATÓPICA: SI/ NO
  - . ALERGIA A ALIMENTOS: SI/ NO
  - . ALERGIA A AB: SI/ NO
  - . OTRAS ALERGIAS ( ESPECIFICAR).
  - . FUMADOR
  
- HERMANOS
  - . ASMA. SI/ NO
  - . DERMATITIS ATÓPICA: SI/ NO
  - . ALERGIA A ALIMENTOS: SI/ NO
  - . ALERGIA A AB: SI/ NO
  - . OTRAS ALERGIAS ( ESPECIFICAR).

## **REVISIÓN ACTUAL**

- TRATAMIENTO ACTUAL CON BRONCODILATADORES: SI / NO
- NÚMERO DE EPISODIOS EN LOS QUE PRECISÓ BRONCODILATADORES DESDE EL ALTA O LA ÚLTIMA REVISIÓN:
- ¿HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL CON LOS PROCESOS CATARRALES?: SI / NO
- PRECISA CORTICOIDES INHALADOS O MONTELUKAST: SI/ NO (ESPECIFICAR)
- CURVA PONDERAL: PESO, TALLA Y PERCENTILES
- EXPLORACIÓN GENERAL
- AP:
- FR:
- SIGNOS DE DIFICULTAD RESPIRATORIA:

## **RESUMEN ANALÍTICA**

IGE TOTAL:

EOSINOFILOS ( PORCENTAJE Y NÚMERO TOTAL)

NÚMERO DE MUESTRAS ENVIADAS A LABORATORIO

EN ESTA VISITA SE ENVÍA MUESTRA : SI/ NO

## **OBSERVACIONES**

## 9.6.- ANEXO 6. SCORE DE GRAVEDAD

### ESCALA DE WOOD-DOWNES-FERRES

<b>SIBILANCIAS</b>	0 No. 1 Final de la espiración. 2 Toda la espiración. 3 Inspiración y espiración.
<b>TIRAJE</b>	0 No. 1 Subcostal + intercostal inferior. 2 Previo + supraclavicular + aleteo nasal. 3 Previo + intercostal superior + supraesternal.
<b>ENTRADA AIRE</b>	0 Buena, simétrica. 1 Regular, simétrica. 2 Muy disminuida. 3 Tórax silente (ausencia de sibilancias).
<b>CIANOSIS</b>	0 No. 1 Sí.
<b>FR</b>	0 < 30 rpm. 1 31-45 rpm. 2 46-60 rpm. 3 > 60 rpm.
<b>FC</b>	0 < 120 lpm. 1 > 120 lpm.

<b>Crisis leve</b>	1-3 puntos.
<b>Crisis moderada</b>	4-7 puntos.
<b>Crisis grave</b>	8-14 puntos.





## *Capítulo 10. Bibliografía*



## **10.1.- BIBLIOGRAFÍA**

---

- <sup>1</sup> Blount RE Jr, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.*1956; 92(3):544-9.
- <sup>2</sup> Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.*1957;66 (3):281-90.
- <sup>3</sup> Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.*1957;66(3):291-300.
- <sup>4</sup> Beem M, Egerer R, Anderson J. Respiratory Syncytial virus neutralizing antibodies in persons residing in Chicago, Illinois. *Pediatrics.*1964;34:761-70.
- <sup>5</sup> Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev.*2004;5 Suppl A:S119-26.
- <sup>6</sup> Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA.* 1999; 20;282(15):1440-6.
- <sup>7</sup> McConnochie KM. Bronchiolitis.What's in the name?. *Am J Dis Child.*1983 ;137(1):11-3.
- <sup>8</sup> Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J.*2003;22(2):S6-10
- <sup>9</sup> Fleming DM, Cross KW. Respiratory syncytial virus or influenza? *Lancet.* 1993;18-25;342 (8886-8887):1507-10.

- <sup>10</sup> Anderson LJ, Heilman CA. Protective and disease-enhancing immune responses to respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1995;171(1):1-7.
- <sup>11</sup> Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161(5):1501-7.
- <sup>12</sup> Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med.* 1995; 332(3):133-8.
- <sup>13</sup> James KM, Gebretsadik T, Escobar GJ, Wu P, Carroll KN, Li SX, et al Risk of childhood asthma following infant bronchiolitis during the respiratory syncytial virus season. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132(1):227-9.
- <sup>14</sup> Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ;92(25):11563-7.
- <sup>15</sup> Rodriguez R. Bronquiolitis. Actualización. *Acta Pediatr Esp* 2006; 64:316-22.
- <sup>16</sup> Glezen WP. Viral respiratory infections. *Pediatr Ann.* 1991;20(8):407-12.
- <sup>17</sup> Brandenburg AH, van Beek R, Moll HA, Osterhaus AD, Claas EC. G protein variation in respiratory syncytial virus group A does not correlate with clinical severity. *J Clin Microbiol.* 2000;38 (10):3849-52.
- <sup>18</sup> Dickens LE, Collins PL, Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1984; 52(2):364-9.

- 
- <sup>19</sup> Devincenzo JP. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. *Pediatr Res.* 2004;56(6):914-7.
- <sup>20</sup> Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res.* 2011;162(1-2):80-99.
- <sup>21</sup> Chaiwatpongsakorn S, Epand RF, Collins PL, Epand RM, Peeples ME. Soluble respiratory syncytial virus fusion protein in the fully cleaved, pretriggered state is triggered by exposure to low-molarity buffer. *J Virol.* 2011 ;85(8):3968-77.
- <sup>22</sup> Kauvar LM, Harcourt JL, Haynes LM, Tripp RA. Therapeutic targeting of respiratory syncytial virus G-protein. *Immunotherapy.* 2010;2(5):655-61.
- <sup>23</sup> Bourgeois C, Bour JB, Lidholt K, Gauthray C, Pothier P. Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *J Virol.* 1998;72(9):7221-7.
- <sup>24</sup> Feldman SA, Audet S, Beeler JA. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol.* 2000;74(14):6442-7.
- <sup>25</sup> Hallak LK, Spillmann D, Collins PL, Peeples ME. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J Virol.* 2000 ;74(22):10508-13.
- <sup>26</sup> Karger A, Schmidt U, Buchholz UJ. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J Gen Virol.* 2001;82(3):631-40.
- <sup>27</sup> Martínez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol.* 2000;81

(11):2715-22.

<sup>28</sup> Techaarpornkul S, Collins PL, Peeples ME. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology*. 2002 ;294(2):296-304.

<sup>29</sup> Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 ;375(9725):1545-55.

<sup>30</sup> Empey KM, Peebles RS Jr, Kolls JK. Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clin Infect Dis*. 2010 ;50(9):1258-67.

<sup>31</sup> Lindquist ME, Mainou BA, Dermody TS, Crowe JE Jr. Activation of protein kinase R is required for induction of stress granules by respiratory syncytial virus but dispensable for viral replication. *Virology*. 2011;413(1):103-10.

<sup>32</sup> Lifland AW, Jung J, Alonas E, Zurla C, Crowe JE Jr, Santangelo PJ. Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS. *J Virol*. 2012 ;86(15):8245-58.

<sup>33</sup> Venter M, van Niekerk S, Rakgantso A, Bent N. Identification of deletion mutant respiratory syncytial virus strains lacking most of the G protein in immunocompromised children with pneumonia in South Africa. *J Virol*. 2011 ;85(16):8453-7.

<sup>34</sup> Eisenhut M. Extrapulmonary manifestations of severe RSV bronchiolitis. *Lancet*. 2006;368(9540):988.

- 
- <sup>35</sup> Rohwedder A, Keminer O, Forster J, Schneider K, Schneider E, Werchau H. Detection of respiratory syncytial virus RNA in blood of neonates by polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1998;54(4):320-7.
- <sup>36</sup> Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009;360(6):588-98.
- <sup>37</sup> González de Dios J, Ochoa Sangrador C; Grupo Investigador del Proyecto BRonquiolititis-Estudio de Variabilidad, Idoneidad y ADecuación. Estudio de variabilidad en el manejo de la bronquiolititis aguda en España en relación con la edad de los pacientes. Estudio multicéntrico nacional (proyecto aBREVIADo). *An Pediatr (Barc)*. 2010;72(1):4-18.
- <sup>38</sup> Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Hospitalización por VRS en la población pediátrica en España. *Epidemiol Infect*. 2003;131(2):867-72.
- <sup>39</sup> López Guinea A, Casado Flores J, Martín Sobrino MA, Espínola Docio B, de la Calle Cabrera T, Serrano A et al. Bronquiolititis grave. Epidemiología y curso clinic de 284 pacientes. *An Pediatr (Barc)*. 2007;67(2):116-22.
- <sup>40</sup> Leader S, Kohlhasse K. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *J Pediatr*. 2003;143(5):S127-32.
- <sup>41</sup> Nolte FS, Marshall DJ, Rasberry C, Schievelbein S, Banks GG, Storch GA, et al. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (9): 2779-86.
- <sup>42</sup> Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol*. 2006; 78 (11): 1498-504.



---

<sup>43</sup> Miron D, Srugo I, Kra-Oz Z, Keness Y, Wolf D, Amirav I, et al. Sole pathogen in acute bronchiolitis: is there a role for other organisms apart from respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29(1):e7-e10.

<sup>44</sup> Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(3): 213-7.

<sup>45</sup> Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2005; 191 (3):382-6.

<sup>46</sup> Calvo C, Pozo F, García-García ML, Sanchez M, Lopez-Valero M, Pérez-Breña P, et al. Detection of new respiratory viruses in hospitalized infants with bronchiolitis: a three-year prospective study. *Acta Paediatr.* 2010;99 (6):883-7.

<sup>47</sup> Brand HK, de Groot R, Galama JM, Brouwer ML, Teuwen K, Hermans PW, et al. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol.* 2012; 47 (4):393-400.

<sup>48</sup> Mullins JA, Lamonte AC, Bresee JS, Anderson LJ. Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 ;22 (10):857-62.

<sup>49</sup> Light M, Bauman J, Mavunda K, Malinoski F, Eggleston M. Correlation between respiratory syncytial virus (RSV) test data and hospitalization of children for RSV lower respiratory tract illness in Florida. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27 (6):512-8.

- 
- <sup>50</sup> Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr.* 2009;98 (1):123-6.
- <sup>51</sup> Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med.* 2004 ;350(5):443-50.
- <sup>52</sup> Glezen WP, Frank AL, Taber LH, Kasel JA. Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *J Infect Dis.* 1984; 150 (6):851-7.
- <sup>53</sup> Lee MS, Greenberg DP, Yeh SH, Yogev R, Reisinger KS, Ward JI, et al. Antibody responses to bovine parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccination and human PIV3 infection in young infants. *J Infect Dis.* 2001;184 (7):909-13.
- <sup>54</sup> Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, Sullivan AF, Forgey T, Clark S, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012;166 (8):700-6.
- <sup>55</sup> Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med.* 1986;315 (2):77-81.
- <sup>56</sup> Whimbey E, Couch RB, Englund JA, Andreeff M, Goodrich JM, Raad II, et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. *Clin Infect Dis.* 1995;21 (2):376-9.
- <sup>57</sup> Kapikian AZ, Bell JA, Mastrota FM, Johnson KM, Chanock RM.. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am J Hyg.*1961; 74: 234-48.

- 
- <sup>58</sup> García García ML, Ordobás Gabin M, Calvo Reya C, González Alvarez M, Aguilar Ruiz J, Arregui Sierra A et al. Infecciones virales del tracto respiratorio inferior en lactantes hospitalizados: Hallazgos etiológicos y clínicos y factores de riesgo. *An Esp Pediatr.* 2001;55 (2):101-7.
- <sup>59</sup> McBride JT. Pulmonary function changes in children after respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Pediatr.* 1999; 135(2):28-32.
- <sup>60</sup> Reid L. Influence of the pattern of structural growth of lung on susceptibility to specific infectious diseases in infants and children. *Pediatr Res.* 1977; 11(3): 210-5.
- <sup>61</sup> Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet.* 2006; 368 (9532): 312-22.
- <sup>62</sup> Sommer C, Resch B, Simões EA. Risk factors for severe respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Open Microbiol J.* 2011;5: 144-54.
- <sup>63</sup> Liese JG, Grill E, Fischer B, Roeckl-Wiedmann I, Carr D, Belohradsky BH; Munich RSV Study Group. Incidence and risk factors of respiratory syncytial virus-related hospitalizations in premature infants in Germany. *Eur J Pediatr.* 2003;162 (4):230-6.
- <sup>64</sup> Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *Exp Lung Res.* 2005; 31 (1):77.
- <sup>65</sup> Sommer C, Resch B, Simões EA. Risk factors for severe respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Open Microbiol J.* 2011; 5:144-54.
- <sup>66</sup> Garcia DF, Hiatt PW, Jewell A, Schoonover SL, Cron SG, Riggs M, et al. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus infections in older children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2007;42 (1):66-74.
- <sup>67</sup> Zachariah P, Ruttenber M, Simões EA. Down syndrome and hospitalizations due to respiratory syncytial virus: a population-based study. *J Pediatr.* 2012

;160 (5):827-31.

<sup>68</sup> Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF Jr, Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr*. 2000; 137(6):865-70.

<sup>69</sup> Ison MG. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses in the setting of bone marrow transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(2):171-6.

<sup>70</sup> Shah JN, Chemaly RF. Management of RSV infections in adult recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(10):2755-63.

<sup>71</sup> Zamora MR, Budev M, Rolfe M, Gottlieb J, Humar A, Devincenzo J, et al. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(4):531-8.

<sup>72</sup> Choudhuri JA, Ogden LG, Ruttenber AJ, Thomas DS, Todd JK, Simoes EA. Effect of altitude on hospitalizations for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 2006;117(2):349-56.

<sup>73</sup> Law BJ, Langley JM, Allen U, Paes B, Lee DS, Mitchell I, et al. The Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada study of predictors of hospitalization for respiratory syncytial virus infection for infants born at 33 through 35 completed weeks of gestation. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(9):806-14.

<sup>74</sup> Carbonell-Estrany X, Quero J, Bustos G, Coteró A, Doménech E, Figueras-Aloy J, et al. Rehospitalization because of respiratory syncytial virus infection in premature infants younger than 33 weeks of gestation: a prospective study. *IRIS Study Group. Pediatr Infect Dis J*. 2000;19(7):592-7.

<sup>75</sup> Figueras-Aloy J, Carbonell-Estrany X, Quero-Jiménez J, Fernández-Colomer B, Guzmán-Cabañas J, Echaniz-Urcelay I, et al. IRIS Study Group. FLIP-2 Study: risk factors linked to respiratory syncytial virus infection requiring

---

hospitalization in premature infants born in Spain at a gestational age of 32 to 35 weeks. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(9):788-93.

<sup>76</sup> Resch B, Pasnocht A, Gusenleitner W, Müller W. Rehospitalisations for respiratory disease and respiratory syncytial virus infection in preterm infants of 29-36 weeks gestational age. *J Infect.* 2005;50(5):397-403.

<sup>77</sup> Mejías A, Chávez-Bueno S, Ríos AM, Aten MF, Raynor B, Peromingo E, et al. Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4700-7.

<sup>78</sup> Chávez-Bueno S, Mejías A, Gómez AM, Olsen KD, Ríos AM, Fonseca-Aten M, et al. Respiratory syncytial virus-induced acute and chronic airway disease is independent of genetic background: an experimental murine model. *Virology.* 2005; 25; 2:46.

<sup>79</sup> Mejías A, Ramilo O. Asma y virus respiratorio sincitial. ¿Mito o realidad? *An Esp Pediatr.* 2000;57(3):199-204.

<sup>80</sup> Mejias A, Hall MW, Ramilo O. Immune monitoring of children with respiratory syncytial virus infection. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013;9(5):393-5.

<sup>81</sup> Techasaensiri B, Techasaensiri C, Mejías A, McCracken GH Jr, Ramilo O. Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(6):519-23.

<sup>82</sup> DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *J Infect Dis.* 2005 ;191(11):1861-8.

<sup>83</sup> Houben ML, Coenjaerts FE, Rossen JW, Belderbos ME, Hofland RW, Kimpen JL, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary

---

respiratory syncytial virus infection in the community. *J Med Virol.* 2010 ;82(7):1266-71.

<sup>84</sup> El Saleeby CM, Devincenzo JP. Respiratory syncytial virus load and disease severity in the community. *J Med Virol.* 2011;83(5):904-5.

<sup>85</sup> Jafri HS, Wu X, Makari D, Henrickson KJ. Distribution of respiratory syncytial virus subtypes A and B among infants presenting to the emergency department with lower respiratory tract infection or apnea. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(4):335-40.

<sup>86</sup> Laham FR, Trott AA, Bennett BL, Kozinetz CA, Jewell AM, Garofalo RP, et al. LDH concentration in nasal-wash fluid as a biochemical predictor of bronchiolitis severity. *Pediatrics.* 2010;125(2):225-33.

<sup>87</sup> Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG, et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2007;195(10):1532-40.

<sup>88</sup> García C, Soriano-Fallas A, Lozano J, Leos N, Gomez AM, Ramilo O, et al . Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(1):86-9.

<sup>89</sup> Larrañaga CL, Ampuero SL, Luchsinger VF, Carrión FA, Aguilar NV, Morales PR, et al. Impaired immune response in severe human lower tract respiratory infection by respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(10):867-73.

<sup>90</sup> Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, Hall MW, et al Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2013 ;207(4):564-73.

---

<sup>91</sup> Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, Tomarello S, Wewers MD, Volk HD, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 2011;37(3):525-32.

<sup>92</sup> Mejias A, Dimo B, Suarez NM, Garcia C, Suarez-Arrabal MC, Jartti T, et al. Whole blood gene expression profiles to assess pathogenesis and disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *PLoS Med.* 2013 ;10(11):e1001549.

<sup>93</sup> Löfgren J, Marttila R, Renko M, Rämet M, Hallman M. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism in respiratory syncytial virus epidemics. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45(7):687-92.

<sup>94</sup> Douville RN, Lissitsyn Y, Hirschfeld AF, Becker AB, Kozyrskyj AL, Liem J, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: no impact on human immune responsiveness to LPS or respiratory syncytial virus. *PLoS One.* 2010 ;5(8):e12087.

<sup>95</sup> Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, van 't Slot R, Wijmenga C, Goeman JJ, Kimpen JL, van Houwelingen HC, Kimman TG, Hoebbe B. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis.* 2007;196(6):826-34.

<sup>96</sup> Thomsen SF, Stensballe LG, Skytthe A, Kyvik KO, Backer V, Bisgaard H. Increased concordance of severe respiratory syncytial virus infection in identical twins. *Pediatrics.* 2008;121(3):493-6.

<sup>97</sup> Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, et al. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis.* 2004;189(11):2057-63.

<sup>98</sup> Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, Lorenz E, Szein MB, Boukhvalova MS, et al. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory

---

syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol.* 2007;179(5):3171-7.

<sup>99</sup> Pino M, Kelvin DJ, Bermejo-Martin JF, Alonso A, Matías V, Tenorio A, et al. Nasopharyngeal aspirate cytokine levels 1 yr after severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(8):791-5.

<sup>100</sup> Bermejo-Martin JF, Tenorio A, Ortiz de Lejarazu R, Eiros JM, Matías V, Dominguez-Gil M, et al. Similar cytokine profiles in response to infection with respiratory syncytial virus type A and type B in the upper respiratory tract in infants. *Intervirology.* 2008;51(2):112-5.

<sup>101</sup> Papadopoulos NG, Gourgiotis D, Javadyan A, Bossios A, Kallergi K, Psarras S, et al. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respir Med.* 2004;98(9):879-82.

<sup>102</sup> Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaeker N, Naranjo C, Van Ranst M. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):3022-30.

<sup>103</sup> Belderbos ME, Houben ML, Wilbrink B, Lentjes E, Bloemen EM, Kimpen JL, et al. Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatrics.* 2011;127(6):e1513-20.

<sup>104</sup> Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(3):788-95.

<sup>105</sup> Grant WB. Variations in vitamin D production could possibly explain the seasonality of childhood respiratory infections in Hawaii. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(9):853.



- 
- <sup>106</sup> Hansdottir S, Monick MM, Lovan N, Powers L, Gerke A, Hunninghake GW. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF-kappaB-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state. *J Immunol.* 2010;184(2):965-74.
- <sup>107</sup> Cabrera Roca G, Domínguez Ortega F, Lafarga Capuz B, Calvo Rosales J. Estudio clinic y epidemiológico de la infección por VRS en lactantes. *An Esp Pediatr.* 1997;46(6):576-80.
- <sup>108</sup> Piippo-Savolainen E, Korppi M. Wheezy babies--wheezy adults? Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing. *Acta Paediatr.* 2008;97(1):5-11.
- <sup>109</sup> Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet.* 1999;354(9178):541-5.
- <sup>110</sup> McIntosh K. Bronchiolitis and asthma: possible common pathogenetic pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 1976;57(6):595-604.
- <sup>111</sup> Sims DG, Downham MA, Gardner PS, Webb JK, Weightman D. Study of 8-year-old children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Br Med J.* 1978;1(6104):11-14.
- <sup>112</sup> Welliver RC. Immunologic mechanisms of virus-induced wheezing and asthma. *J Pediatr.* 1999;135(2 Pt 2):14-20.
- <sup>113</sup> Guo-Parke H, Canning P, Douglas I, Villenave R, Heaney LG, Coyle PV, Lyons JD, Shields MD, Power UF. Relative respiratory syncytial virus cytopathogenesis in upper and lower respiratory tract epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(7):842-51.
- <sup>114</sup> Castro J, Tellería JJ, Blanco-Quirós A. Susceptibility genes for asthma and allergy: hits and questions. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2001;11(2):73-8.

- <sup>115</sup> Goetghebuer T, Isles K, Moore C, Thomson A, Kwiatkowski D, Hull J. Genetic predisposition to wheeze following respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(5):801-3.
- <sup>116</sup> Singh AM, Moore PE, Gern JE, Lemanske RF Jr, Hartert TV. Bronchiolitis to asthma: a review and call for studies of gene-virus interactions in asthma causation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(2):108-19.
- <sup>117</sup> Mejias A. Virus Respiratorio Sincitial y Asma (Tesis doctoral) Málaga : Universidad de Málaga. Facultad de Medicina, 2010.
- <sup>118</sup> Piedimonte G. Contribution of neuroimmune mechanisms to airway inflammation and remodeling during and after respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(2):S66-74.
- <sup>119</sup> Schwarze J, O'Donnell DR, Rohwedder A, Openshaw PJ. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(7):801-5.
- <sup>120</sup> Blanco del Val A. Infecciones por Virus Respiratorio Sincitial. Aportaciones de una década. (Tesis doctoral). Valladolid: Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina, 2010.
- <sup>121</sup> Kaul TN, Welliver RC, Wong DT, Udwadia RA, Riddlesberger K, Ogra PL. Secretory antibody response to respiratory syncytial virus infection. *Am J Dis Child*. 1981;135(11):1013-6.
- <sup>122</sup> Kimpen JL, Garofalo R, Welliver RC, Fujihara K, Ogra PL. An ultrastructural study of the interaction of human eosinophils with respiratory syncytial virus. *Pediatr Allergy Immunol*. 1996;7(1):48-53.
- <sup>123</sup> Patel JA, Kunimoto M, Sim TC, Garofalo R, Elliott T, Baron S, et al. Interleukin-1 alpha mediates the enhanced expression of intercellular

---

adhesion molecule-1 in pulmonary epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;13(5):602-9.

<sup>124</sup> Midulla F, Villani A, Panuska JR, Dab I, Kolls JK, Merolla R, et al Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J Infect Dis.* 1993;168(6):1515-9.

<sup>125</sup> Noah TL, Henderson FW, Wortman IA, Devlin RB, Handy J, Koren HS, et al. Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *J Infect Dis.* 1995;171(3):584-92.

<sup>126</sup> Levine SJ. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J Investig Med.* 1995;43(3):241-9.

<sup>127</sup> O'Donnell DR, McGarvey MJ, Tully JM, Balfour-Lynn IM, Openshaw PJ. Respiratory syncytial virus RNA in cells from the peripheral blood during acute infection. *J Pediatr.* 1998;133(2):272-4.

<sup>128</sup> Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, et al. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1518-23.

<sup>129</sup> Bont L, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Vught AJ, Kimpen JL. Monocyte interleukin-12 production is inversely related to duration of respiratory failure in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2000;181(5):1772-5.

<sup>130</sup> Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, et al. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol.* 2006;177(1):322-32.

<sup>131</sup> Murawski MR, Bowen GN, Cerny AM, Anderson LJ, Haynes LM, Tripp RA, et al. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol.* 2009;83(3):1492-500.

- <sup>132</sup> Rudd BD, Burstein E, Duckett CS, Li X, Lukacs NW. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J Virol.* 2005;79(6):3350-7.
- <sup>133</sup> Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000;1(5):398-401.
- <sup>134</sup> Haeberle HA, Takizawa R, Casola A, Brasier AR, Dieterich HJ, Van Rooijen N, et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *J Infect Dis.* 2002;186(9):1199-206.
- <sup>135</sup> Beyer M, Bartz H, Hörner K, Doths S, Koerner-Rettberg C, Schwarze J. Sustained increases in numbers of pulmonary dendritic cells after respiratory syncytial virus infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(1):127-33.
- <sup>136</sup> Smit JJ, Rudd BD, Lukacs NW. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J Exp Med.* 2006;203(5):1153-9.
- <sup>137</sup> Wang H, Peters N, Schwarze J. Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 2006;177(9):6263-70.
- <sup>138</sup> Braciale TJ, Sun J, Kim TS. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):295-305.
- <sup>139</sup> Fishaut M, Tubergen D, McIntosh K. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *J Pediatr.* 1980;96(2):179-86.

---

<sup>140</sup> Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(6):633-9.

<sup>141</sup> Román M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendaño LF, Simon V, Escobar AM, et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 ;156(1):190-5.

<sup>142</sup> Brandenburg AH, Kleinjan A, van Het Land B, Moll HA, Timmerman HH, et al. Type 1-like immune response is found in children with respiratory syncytial virus infection regardless of clinical severity. *J Med Virol.* 2000;62(2):267-77.

<sup>143</sup> Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2001 ;184(4):393-9.

<sup>144</sup> Kallal LE, Hartigan AJ, Hogaboam CM, Schaller MA, Lukacs NW. Inefficient lymph node sensitization during respiratory viral infection promotes IL-17-mediated lung pathology. *J Immunol.* 2010;185(7):4137-47.

<sup>145</sup> Lukacs NW, Smit JJ, Mukherjee S, Morris SB, Nunez G, Lindell DM. Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation. *J Immunol.* 2010;185(4):2231-9.

<sup>146</sup> Mukherjee S, Lindell DM, Berlin AA, Morris SB, Shanley TP, Hershenson MB, et al IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *Am J Pathol.* 2011;179(1):248-58.

<sup>147</sup> de Bree GJ, Daniels H, Schilfgaarde Mv, Jansen HM, Out TA, van Lier RA, et al. Characterization of CD4+ memory T cell responses directed against common respiratory pathogens in peripheral blood and lung. *J Infect Dis.* 2007 ;195(11):1718-25.

- <sup>148</sup> Fulton RB, Meyerholz DK, Varga SM. Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 2010;185(4):2382-92.
- <sup>149</sup> Ruckwardt TJ, Bonaparte KL, Nason MC, Graham BS. Regulatory T cells promote early influx of CD8+ T cells in the lungs of respiratory syncytial virus-infected mice and diminish immunodominance disparities. *J Virol.* 2009;83(7):3019-28.
- <sup>150</sup> Loebbermann J, Schnoeller C, Thornton H, Durant L, Sweeney NP, Schuijs M, et al. IL-10 regulates viral lung immunopathology during acute respiratory syncytial virus infection in mice. *PLoS One.* 2012;7(2):e32371.
- <sup>151</sup> Sun J, Cardani A, Sharma AK, Laubach VE, Jack RS, Müller W, et al. Autocrine regulation of pulmonary inflammation by effector T-cell derived IL-10 during infection with respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog.* 2011;7(8):e1002173.
- <sup>152</sup> Weiss KA, Christiaansen AF, Fulton RB, Meyerholz DK, Varga SM. Multiple CD4+ T cell subsets produce immunomodulatory IL-10 during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 2011;187(6):3145-54.
- <sup>153</sup> Rautajoki KJ, Kylaniemi MK, Raghav SK, Rao K, Lahesmaa R. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann Med.* 2008;40(5):322-35.
- <sup>154</sup> Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med.* 2002;8(6):567-73.
- <sup>155</sup> Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu Rev Pathol.* 2013;8:477-512.

- 
- <sup>156</sup> Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(1):55-60.
- <sup>157</sup> Bashyam H. Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. *J Exp Med.* 2007;204(2):237.
- <sup>158</sup> Coffman RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol.* 2006;7(6):539-41.
- <sup>159</sup> Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):153-60.
- <sup>160</sup> Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 1999;18(2):115-22.
- <sup>161</sup> Johnson TR, Varga SM, Braciale TJ, Graham BS. V beta14(+) T cells mediate the vaccine-enhanced disease induced by immunization with respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein but not with formalin-inactivated RSV. *J Virol.* 2004;78(16):8753-60.
- <sup>162</sup> Fernald GW, Almond JR, Henderson FW. Cellular and humoral immunity in recurrent respiratory syncytial virus infections. *Pediatr Res.* 1983;17(9):753-8.
- <sup>163</sup> The Childhood Asthma Management Program Research Group Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma.. *N Engl J Med.* 2000;343(15):1054-63.
- <sup>164</sup> Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax.* 2006 Mar; 61(3):202-8.

- 
- <sup>165</sup> Ichinohe S, Hussain IR, Johnston SL. Cytokine production of RSV/PHA-stimulated tonsillar mononuclear cells: influences of age and atopy. *Eur Respir J*. 2003;22(2):317-22.
- <sup>166</sup> Chung HL, Park HJ, Kim SY, Kim SG. Age-related difference in immune responses to respiratory syncytial virus infection in young children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(2):94-9.
- <sup>167</sup> Bystrom J, Al-Adhoubi N, Al-Bogami M, Jawad AS, Mageed RA. Th17 lymphocytes in respiratory syncytial virus infection. *Viruses*. 2013;5(3):777-91.
- <sup>168</sup> Thornburg NJ, Shepherd B, Crowe JE Jr. Transforming growth factor beta is a major regulator of human neonatal immune responses following respiratory syncytial virus infection. *J Virol*. 2010;84(24):12895-902.
- <sup>169</sup> García-Merino I, de Las Cuevas N, Jiménez JL, Gallego J, Gómez C, Prieto C, et al; Spanish HIV BioBank. The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology*. 2009 Mar 9;6:27.
- <sup>170</sup> Camilla C, Mély L, Magnan A, Casano B, Prato S, Debono S, et al. Flow cytometric microsphere-based immunoassay: analysis of secreted cytokines in whole-blood samples from asthmatics. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 ;8(4):776-84.
- <sup>171</sup> Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry*. 2001;45(1):27-36.
- <sup>172</sup> Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: asystematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-128. Erratum in: *Lancet*.2013 Feb 23;381(9867):628.)



- <sup>173</sup> García CG, Bhole R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, et al . Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. *Pediatrics*. 2010;126(6):e1453-60.
- <sup>174</sup> Bacharier LB, Cohen R, Schweiger T, Yin-Declue H, Christie C, Zheng J, et al. Determinants of asthma after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):91-100.
- <sup>175</sup> Agoti CN, Mwihuri AG, Sande CJ, Onyango CO, Medley GF, Cane PA, et al. Genetic relatedness of infecting and reinfecting respiratory syncytial virus strains identified in a birth cohort from rural Kenya. *J Infect Dis*. 2012 ;206(10):1532-41.
- <sup>176</sup> Kong X, Shou H, Liu C, Jiang Z. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Chin Med J (Engl)*. 2001;114 (4):364-8.
- <sup>177</sup> Papadopoulos NG, Gourgiotis D, Javadyan A, Bossios A, Kallergi K, Psarras S, et al. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respir Med*. 2004;98(9):879-82.
- <sup>178</sup> Ichinohe S, Hussain IR, Johnston SL. Cytokine production of RSV/PHA-stimulated tonsillar mononuclear cells: influences of age and atopy. *Eur Respir J*. 2003;22(2):317-22.
- <sup>179</sup> Chung HL, Park HJ, Kim SY, Kim SG. Age-related difference in immune responses to respiratory syncytial virus infection in young children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(2):94-9.
- <sup>180</sup> Marr N, Wang TI, Kam SH, Hu YS, Sharma AA, Lam A, et al Attenuation of respiratory syncytial virus-induced and RIG-I-dependent type I IFN responses in human neonates and very young children. *J Immunol*. 2014;192(3):948-57.

- 
- <sup>181</sup> Nagayama Y, Tsubaki T, Nakayama S, Sawada K, Taguchi K, Tateno N, et al. Gender analysis in acute bronchiolitis due to respiratory syncytial virus.. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006;17(1):29-36.
- <sup>182</sup> Grzeoek E, Kołtan S, Dębski R, Wysocki M, Gruszka M, Kubicka M, et al. Concentrations of IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$  and activity of CD4(+), CD8(+) and NK cells at admission in children with viral bronchiolitis. *Exp Ther Med.* 2010 ;1(5):873-877.
- <sup>183</sup> van Schaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver RC 2nd, Welliver RC. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(4):630-6.
- <sup>184</sup> Tripp RA, Moore D, Barskey A 4th, Jones L, Moscattiello C, Keyserling H, et al. Peripheral blood mononuclear cells from infants hospitalized because of respiratory syncytial virus infection express T helper-1 and T helper-2 cytokines and CC chemokine messenger RNA. *J Infect Dis.* 2002 ;185(10):1388-94.
- <sup>185</sup> Alonso Fernández J, Roine I, Vasquez A, Cáneo M. Soluble interleukin-2 receptor (sCD25) and interleukin-10 plasma concentrations are associated with severity of primary respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Eur Cytokine Netw.* 2005;16(1):81-90.
- <sup>186</sup> Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, Gaggero AA, Díaz PV. T helper1/T helper2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics* 2006; 117:5 e878-e886
- <sup>187</sup> Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, et al. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J.* 1999;14(1):144-9.
- <sup>188</sup> Smyth MJ, Zachariae CO, Norihisa Y, Ortaldo JR, Hishinuma A, Matsushima K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte

---

subsets. *J Immunol.* 1991;146(11):3815-23.

<sup>189</sup> Kim CK, Callaway Z, Fujisawa T. Infection, eosinophilia and childhood asthma. *Asia Pac Allergy.* 2012;2(1):3-14.

<sup>190</sup> Wu P, Dupont WD, Griffin MR, Carroll KN, Mitchel EF, Gebretsadik T, et al. Evidence of a causal role of winter virus infection during infancy in early childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(11):1123-9.

<sup>191</sup> Simoes EA, Groothuis JR, Carbonell-Estrany X, Rieger CH, Mitchell I, Fredrick LM, et al; Palivizumab Long-Term Respiratory Outcomes Study Group. Palivizumab prophylaxis, respiratory syncytial virus, and subsequent recurrent wheezing. *J Pediatr.* 2007;151(1):34-42.

<sup>192</sup> Blanken MO, Rovers MM, Molenaar JM, Winkler-Seinstra PL, Meijer A, Kimpen JL, Bont L; Dutch RSV Neonatal Network. Respiratory syncytial virus and recurrent wheeze in healthy preterm infants. *N Engl J Med.* 2013 ;368(19):1791-9.

<sup>193</sup> Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature.* 2010;466(7309):973-7.

<sup>194</sup> Connors M, Giese NA, Kulkarni AB, Firestone CY, Morse HC 3rd, Murphy BR. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol.* 1994 ;68(8):5321-5.

<sup>195</sup> Weiss KA, Christiaansen AF, Fulton RB, Meyerholz DK, Varga SM. Multiple CD4+ T cell subsets produce immunomodulatory IL-10 during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 2011;187(6):3145-54.

- 
- <sup>196</sup> de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991;174(4):915-24.
- <sup>197</sup> Vieira RA, Diniz EM, Ceccon ME. Correlation between inflammatory mediators in the nasopharyngeal secretion and in the serum of children with lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus and disease severity. *J Bras Pneumol*. 2010;36(1):59-66.
- <sup>198</sup> Schuurhof A, Janssen R, de Groot H, Hodemaekers HM, de Klerk A, Kimpen JL, et al. Local interleukin-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with post-bronchiolitis wheeze. *Respir Res*. 2011;12:121.
- <sup>199</sup> Hizawa N, Kawaguchi M, Huang SK, Nishimura M. Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin Exp Allergy*. 2006 ;36(9):1109-14.
- <sup>200</sup> Bystrom J, Al-Adhoubi N, Al-Bogami M, Jawad AS, Mageed RA. Th17 lymphocytes in respiratory syncytial virus infection. *Viruses*. 2013;5(3):777-91.
- <sup>201</sup> Moreno-Solís G, Torres-Borrego J, de la Torre-Aguilar MJ, Fernández-Gutiérrez F, Llorente-Cantarero FJ, Pérez-Navero JL. Analysis of the local and systemic inflammatory response in hospitalized infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014. Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2014.02.002>
- <sup>202</sup> Balfour-Lynn IM, Valman HB, Wellings R, Webster AD, Taylor GW, Silverman M. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene E4 production in wheezy infants. *Clin Exp Allergy*. 1994;24(2):121-6.

---

<sup>203</sup> Azevedo I, de Blic J, Dumarey CH, Scheinmann P, Vargaftig BB, Bachelet M. Increased spontaneous release of tumour necrosis factor-alpha by alveolar macrophages from wheezy infants. *Eur Respir J*. 1997;10(8):1767-73.

<sup>204</sup> Patel DA, You Y, Huang G, Byers DE, Kim HJ, Agapov E, et al Interferon response and respiratory virus control are preserved in bronchial epithelial cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134 (6): 1402–1412. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.013>

<sup>205</sup> Foronjy RF, Taggart CC, Dabo AJ, Weldon S, Cummins N, Geraghty P. Type-I interferons induce lung protease responses following respiratory syncytial virus infection via RIG-I-like receptors. *Mucosal Immunol*. 2015;8(1):161-175

<sup>206</sup> Pitrez PM, Ponzi D, Machado DC, Bauer ME, Jones MH, Stein RT. Discrepancy between cytokine production from peripheral blood mononuclear cells and nasal secretions among infants with acute bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;92(6):659-62.

<sup>207</sup> Ingram JM, Rakes GP, Hoover GE, Platts-Mills TA, Heymann PW. Eosinophil cationic protein in serum and nasal washes from wheezing infants and children. *J Pediatr*. 1995;127(4):558-64.